

Untersuchungen zur Authentizitätskontrolle von ausgewählten Kräutern und
Gewürzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

von Veronika Magdalena Huber

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur Authentizitätskontrolle von ausgewählten Kräutern und
Gewürzen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

von Veronika Magdalena Huber
aus München
München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und -analytik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Mitbetreuung durch: Dr. Christoph Gottschalk

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Manfred Gareis
Korreferent: Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>
ACN	Acetonitril
ASTA	American-Spices-Trade-Association
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
ESA	European Spice Association
Da	Dalton
DLMBK	Deutsche Lebensmittelbuch Kommission
DMSO	Dimethylsulfoxid
EU	Europäische Union
FTIR	Fourier Transform Infrarotspektrometer
HCCA	α -Cyano-4-Hydroxymizsäure
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie
ISO	Internationale Organisation für Normung
ITC	International Trade Centre
KbE/g	Kolonie bildende Einheiten / Gramm
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
M	Mol
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight
MEA+	Malz Extrakt Agar plus Novobiocin
MS	Massenspektrometrie
MSP	Main Spectra Profile / Referenzspektrum
<i>P.</i>	<i>Pectobacterium</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
RSD	Relative Standardabweichung
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SD	Standardabweichung
sp.	Spezies (Einzahl)
spp.	Spezies (Mehrzahl)
subsp.	Subspezies
TCA	Trichloressigsäure
w/w	weight per weight

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Literatur.....	11
2.1	Kräuter und Gewürze.....	11
2.1.1	Definitionen und Einteilung.....	11
2.1.2	Wirtschaftliche Aspekte.....	12
2.1.3	Paprika	14
2.1.4	Oregano	18
2.1.5	Pfeffer	20
2.2	Lebensmittelbetrug	22
2.2.1	Definition und rechtliche Grundlage	22
2.2.2	Maßnahmen gegen Lebensmittelbetrug	24
2.2.3	Betrug bei Kräutern und Gewürzen	25
2.2.4	Analytische Methoden zum Nachweis von Verfälschungen bei Kräutern und Gewürzen.....	27
2.3	MALDI-TOF Massenspektrometrie	29
2.3.1	Massenspektrometrie.....	29
2.3.2	MALDI-TOF Massenspektrometrie	29
2.3.3	Einsatzbereiche.....	32
3	Material und Methoden.....	34
3.1	Material.....	34
3.1.1	Pflanzliches Untersuchungsmaterial.....	34
3.1.2	Probenvorbereitung, Extraktion und Bestimmung von Einflussfaktoren	37
3.1.3	MALDI-TOF Massenspektrometrie	39
3.1.4	Mikrobiologische Untersuchungen.....	40
3.2	Methoden	42
3.2.1	Entwicklung und Optimierung der Extraktionsmethoden	42
3.2.2	MALDI-TOF MS Messung	50
3.2.3	Erstellung von Referenzspektren und Identifikation mittels MALDI-Biotyper.....	52

3.2.4	Bestimmung von Einflussfaktoren auf die MALDI-TOF-MS Spektren	53
3.2.5	Herstellung und Messung künstlich verfälschter Testmuster.....	61
3.2.6	Messung von Realproben	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Paprika	63
4.1.1	Entwicklung und Optimierung der Extraktionsmethode	63
4.1.2	Einflussfaktoren auf das MALDI-TOF MS Spektrum.....	69
4.1.2.1	Einfluss der Trocknung auf das Spektrum	69
4.1.2.2	Einfluss einzelner Bestandteile von Paprika.....	72
4.1.2.3	Einfluss mikrobieller Kontamination von Paprika	73
4.1.2.4	Einfluss durch Sortenunterschiede	78
4.1.3	Erstellung von Referenzspektren mittels MALDI-Biotyper	80
4.1.4	Detektion von Produktverfälschungen	81
4.1.5	Messung von Realproben	84
4.2	Oregano	86
4.2.1	Entwicklung und Optimierung einer Extraktionsmethode	86
4.2.2	Einflussfaktoren auf das MALDI-TOF MS Spektrum.....	93
4.2.3	Erstellung von Referenzspektren.....	95
4.2.4	Detektion von Produktverfälschungen	96
4.2.5	Messung von Realproben	98
4.3	Pfeffer	100
4.3.1	Entwicklung und Optimierung der Extraktionsmethode	100
4.3.2	Erstellung von Referenzspektren.....	107
4.3.3	Detektion von Produktverfälschungen	108
4.3.4	Messung von Realproben	111
5	Diskussion.....	113
5.1	Probenvorbereitung und Extraktion für die MALDI-TOF MS Messung.....	113
5.2	Einflussfaktoren	117
5.3	Detektion von Produktverfälschungen	121
5.4	Messung von Realproben	122

5.5	Möglichkeiten und Grenzen	123
6	Zusammenfassung	125
7	Summary	126
8	Literaturverzeichnis	127
9	Abbildungsverzeichnis	142
10	Tabellenverzeichnis	147
11	Anhang	149
12	Danksagung	152

1 Einleitung

Kräuter und Gewürze sind wertvolle internationale gehandelte Produkte, deren globaler Marktwert sich 2019 auf ca. 11,5 Milliarden U.S. Dollar belief (Statista 2020). U.a. aus diesem Grund rangieren sie unter den ersten zehn Lebensmitteln, die am stärksten von Lebensmittelbetrug bedroht sind (EU-Parlament 2013). Lebensmittelbetrug oder „Food Fraud“ beschreibt die vorsätzliche Verfälschung von Lebensmitteln zur Gewinnsteigerung und hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen (BfR 2016a). Einerseits steigt die Aufdeckungsrate durch fortschreitende Technik im Bereich von Analysemethoden, andererseits haben Betrüger durch die Globalisierung und die damit einhergehenden langen, undurchsichtigen Handelswege immer mehr Möglichkeiten Waren unentdeckt zu verfälschen (Galvin-King et al. 2018).

Eine wichtige Voraussetzung zur Kontrolle von Produktverfälschungen ist die Verfügbarkeit verlässlicher und sensibler Analysemethoden. Für Kräuter und Gewürze kamen in den letzten Jahren beispielsweise DNA-Barcoding, Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR) Spektroskopie oder Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LCMS/MS) zum Einsatz (Black et al. 2016).

Eine weitere vielversprechende Methode ist die Matrix-unterstützte-Laser-Desorption/Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) MS, die vor allem in der Routinediagnostik zur Identifizierung von Bakterien eingesetzt wird (Schubert et al. 2011). Aber auch für die Authentizitätskontrolle von Fischen, Milch oder Honig hat sich dieses Verfahren in den letzten Jahren bewährt (Calvano et al. 2012, Bi et al. 2019). Dabei konnten u.a. durch den Abgleich von Rohwaren-Massenspektren mit hinterlegten Referenzspektren von authentischen Proben Verfälschungen detektiert werden (fingerprinting). Die Vorteile dieser Methode sind vor allem die Zeitersparnis, die einfache Durchführung und die geringen Verbrauchskosten. Zu MALDI-TOF MS „fingerprint“ Analysen von Kräutern und Gewürzen, auch hinsichtlich der Authentizitätskontrolle, existieren bisher jedoch kaum Daten.

Ziel dieser Studie war es, Methoden für die Probenvorbereitung und Extraktion von drei ausgewählten Kräuter- und Gewürzmatrices (Paprika, Oregano und Pfeffer) zur Überprüfung der Authentizität mittels MALDI-TOF MS zu entwickeln und zu optimieren. Darüber hinaus sollte überprüft werden, inwieweit ausgewählte Faktoren wie Trocknung, Sortenunterschiede oder mikrobielle Kontamination die Qualität der Massenspektren beeinflussen können. Des

Weiteren sollte beurteilt werden, ob und wie sensitiv Beimischungen mit geringwertiger Rohware mittels der entwickelten Methodik detektiert werden können. Abschließend sollten, u.a. zur Überprüfung der Robustheit der Methodik, Realproben aus dem Handel gemessen und mit den erstellten Referenzspektren abgeglichen werden.

2 Literatur

2.1 Kräuter und Gewürze

2.1.1 Definitionen und Einteilung

Die Deutsche Lebensmittelbuch Kommission (DLMBK) definiert in ihren Leitsätzen Gewürze und Kräuter als „...Pflanzenteile, die wegen ihres Gehaltes an natürlichen Inhaltsstoffen als geschmack- und/oder geruchgebende Zutaten zu Lebensmitteln bestimmt sind.“ (BMEL 2008). Obwohl der Begriff „Gewürze“ Kräuter miteinschließt, besitzen sie unterschiedliche Definitionen. Kräuter sind demnach frische oder getrocknete, aromatische Blätter, Blüten oder Sprossen, während Gewürze alle Pflanzenteile exklusive der Blätter bezeichnen und vorwiegend in getrockneter Form vorkommen (Peter et al. 2012).

Die Internationale Organisation für Normung (ISO) listet insgesamt 109 verschiedene Gewürze (Parthasarathy et al. 2008). Jedoch unterscheiden sich Gewürzlisten international. So beschreiben beispielsweise die American-Spice-Trade-Association (ASTA) 57, das Spice Board India 52 und die Leitsätze der DLMBK 45 Gewürze (BMEL 2008, SpiceBoardIndia 2015, ASTA 2016). Neben einer Klassifizierung nach botanischer Herkunft erfolgt die Einteilung von Gewürzen oftmals nach Pflanzenteilen bzw. -organen (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Organspezifische Einteilung v. Gewürzen (Parthasarathy et al. 2008)

Pflanzenorgan	Beispiele
Blatt	Oregano, Lorbeerblatt, Basilikum, Minze, Rosmarin, Majoran
Frucht	Paprika, Pfeffer, Kardamom
Knolle	Zwiebel, Knoblauch
Knospen	Nelke
Rhizom	Ingwer, Kurkuma
Rinde	Zimt
Samen	Kümmel, Koriander, Fenchel, Anis, Senf
Samenkern	Muskatnuss
Schote	Vanille
Stempel	Safran
Wurzel	Meerrettich

2.1.2 Wirtschaftliche Aspekte

Der weltweite Handel mit Kräutern und Gewürzen ist ein wachsendes Milliardenengeschäft. Gemäß dem International Trade Centre (ITC) lag der weltweite Importwert von Gewürzen und Kräutern im Jahr 2008 noch bei ca. 4,8 Milliarden Euro. Im Jahr 2018 war der Wert schon auf über 8,8 Milliarden Euro gestiegen, was einer Steigerung von ca. 80 Prozent innerhalb von 10 Jahren entspricht (ITC 2018).

Allein Deutschland importierte im Jahr 2018 über 130.000 Tonnen unverarbeitete Gewürze und Kräuter mit einem Gesamtwert von 540,528 Millionen Euro. Importmengen und -werte einzelner Gewürze sind in Abbildung 1 dargestellt. Pfeffer war mit einer Menge von knapp 28.000 Tonnen das am meisten importierte Gewürz. Alle Angaben beruhen auf Daten der amtlichen Außenhandelsstatistik und dem ITC (Gewürzindustrie 2018, ITC 2018).

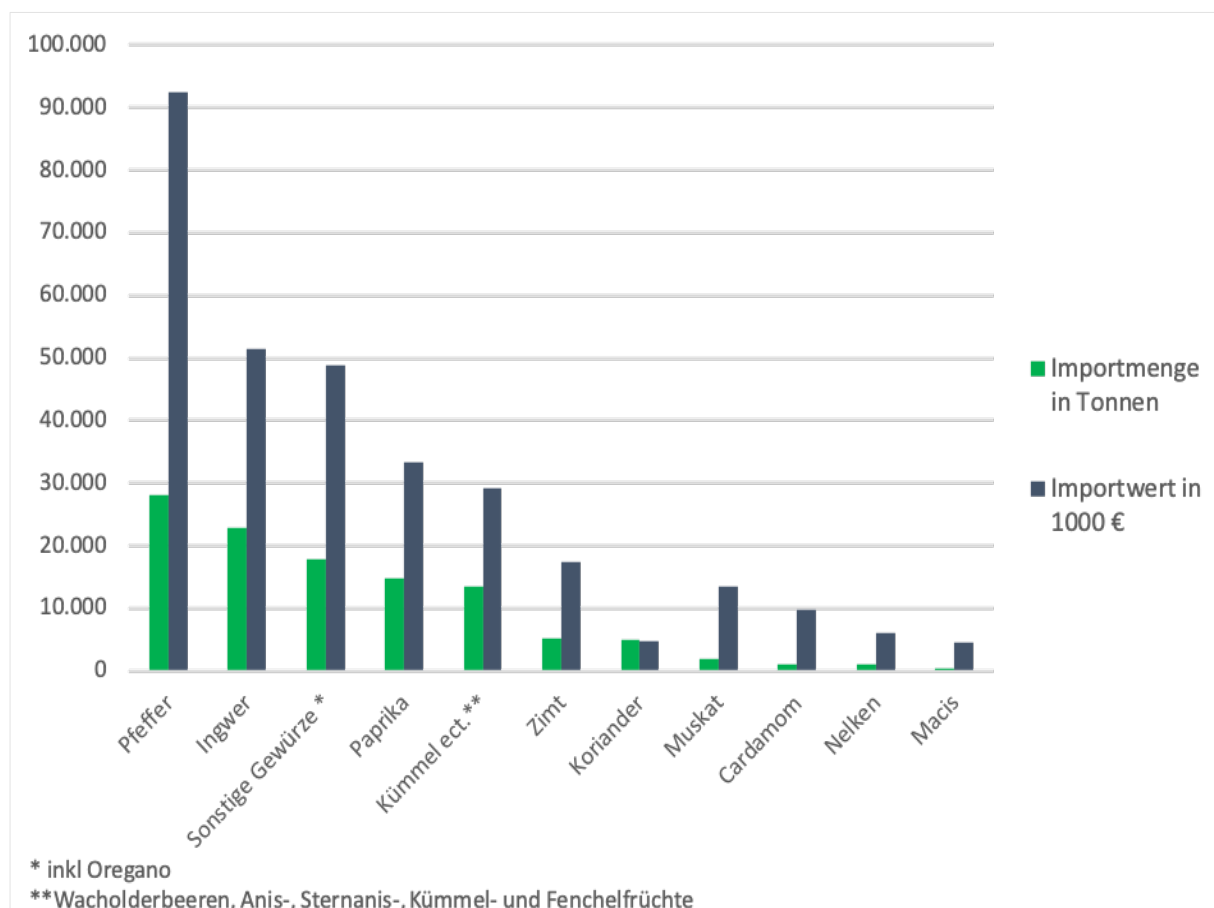


Abbildung 1: Importmengen und -werte einzelner Gewürze in Deutschland aus dem Jahr 2018 (Gewürzindustrie 2018, ITC 2018)

Der Inlandsverbrauch von unverarbeiteten Gewürzen und Kräutern in Deutschland ergibt sich aus den Importmengen abzüglich der Exporte und ist in den letzten Jahren ebenfalls kontinuierlich angestiegen. Alle Werte von 2008 bis 2018 sind in Abbildung 2 dargestellt.

Im Jahr 2018 wurden in Deutschland rund 84.000 Tonnen unverarbeitete Gewürze und Kräuter verbraucht, während es zehn Jahre früher noch 52.000 Tonnen waren. Vor allem die Importmenge hat in dieser Zeitspanne um ca. 50 % zugenommen. Die Exportmenge dagegen konnte nur eine Steigerung von etwa 30 % verzeichnen. Die hauptexportierten Gewürze im Jahr 2018 waren Pfeffer (ca. 14.000 Tonnen), gefolgt von Gewürzmischungen (ca. 8000 Tonnen) und Paprika (ca. 7000 Tonnen). Alle Angaben beruhen auf Daten der amtlichen Außenhandelsstatistik und dem ITC (Gewürzindustrie 2018, ITC 2018).

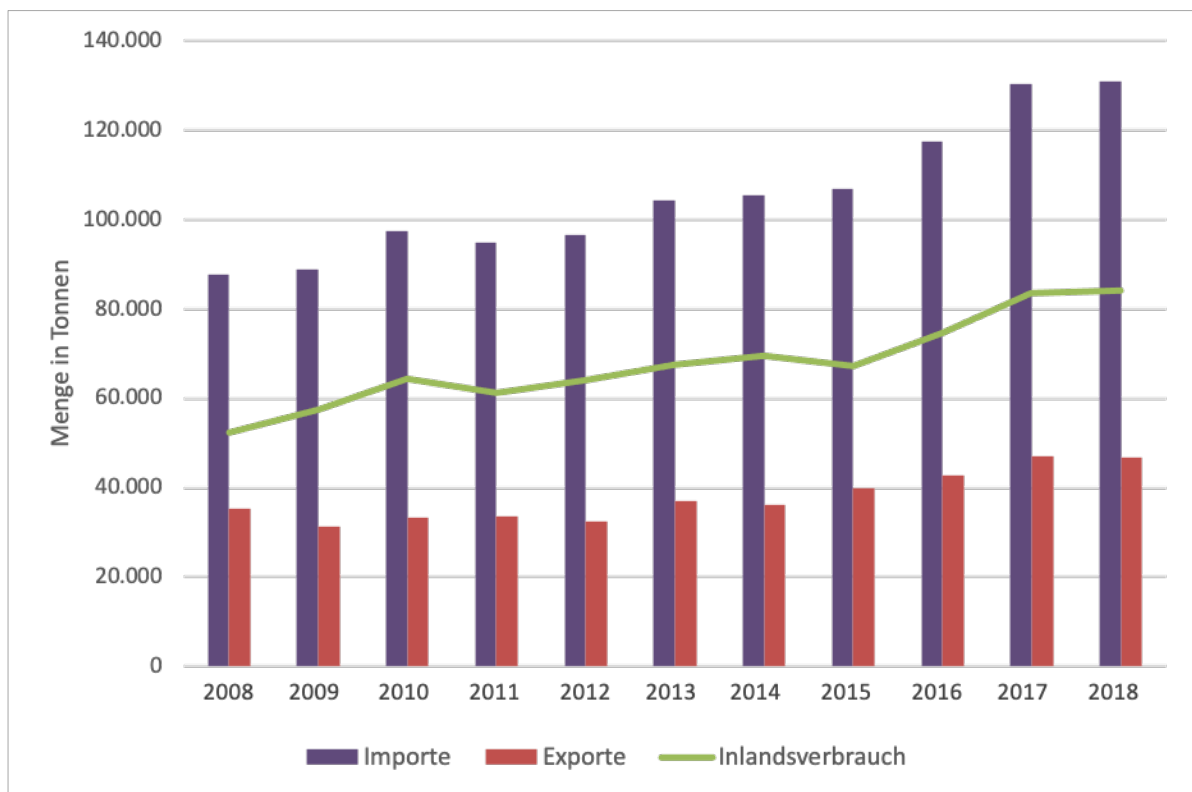


Abbildung 2: Importe, Exporte und Inlandsverbrauch von unverarbeiteten Gewürzen in Deutschland von 2008 bis 2018 (Gewürzindustrie 2018)

2.1.3 Paprika

2.1.3.1 Taxonomie und Herkunft

Der Begriff Paprika kommt aus dem Ungarischen und ist über das Serbische und Lateinische bis zum Sanskrit (pippali = „Beere“) zurückzuführen (Dudenredaktion 2007). Paprika beschreibt die Pflanzengattung *Capsicum* aus der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae), welche ursprünglich aus Südamerika stammt (Lieberei et al. 2007). Diese umfasst über 20 Arten, von denen 5 domestiziert sind (s. Tabelle 2). In vielen Europäischen Sprachen wird unter dem Begriff „Paprika“ nur die Gemüsepaprika verstanden (Kahl et al. 2015). Der Terminus stellt jedoch einen Oberbegriff dar, unter dem alle bekannten Paprika-Chili- und Peperoni-Sorten einzuordnen sind (De 2003, Berke et al. 2012).

Tabelle 2: Die domestizierten *Capsicum*-Arten, ihre Herkunft und Sortenbeispiele (McLeod et al. 1982, Breitner 2020)

Spezies	Herkunft	Sortenbeispiele
<i>Capsicum annuum</i> L.	Mexiko, Zentralamerika	Fresno und Szegediner (Gewürzpaprika), Block- und Spitzpaprika, Jalapeño, Cayenne
<i>Capsicum baccatum</i> L.	Bolivien	Aji Amarillo, Lemon Drop
<i>Capsicum chinense</i> L.	Südamerika	Habanero
<i>Capsicum frutescens</i> L.	Südamerika	Thai Chili, Tabasco, Bird's Eye
<i>Capsicum pubescens</i> L.	Bolivien	Rocoto, Manzano Rojo

2.1.3.2 Herstellung und Verwendung

Das Gewürz Paprika wird aus den reifen Früchten bestimmter Sorten der Pflanzenart *Capsicum annuum* L., auch Spanischer Pfeffer genannt, gewonnen und zählt somit zu den Fruchtgewürzen (Parthasarathy et al. 2008). Die Früchte (s. Abbildung 3) bestehen aus einer festen Haut (Exokarp), dem Fruchtfleisch (Mesokarp) und einer inneren Wand (Endokarp). Die Samen befinden sich hauptsächlich an der zentralen Plazenta, aber auch an den Scheidewänden (Franke et al. 2012). Die einzelnen Gewürzpaprikasorten unterscheiden sich in der Größe, Form, Farbe und Schärfe der Früchte. Sie zeichnen sich jedoch immer durch dünnes Fruchtfleisch, einen hohen Trockensubstanzgehalt und ein würziges Aroma aus und sind dadurch beispielsweise von den milden, dickwandigen Gemüsepaprika und den

schärferen Chilis und Jalapeños (alle ebenfalls *Capsicum annum* L.) abzugrenzen (Rimbach et al. 2015). Die sehr scharfen Habaneros sind zwar ebenfalls verwandt mit den Gewürzpaprika, gehören jedoch der Pflanzenart *Capsicum chinense* L. an (Ravindran 2017).



Abbildung 3: *Capsicum annum* L. Illustration (Soworby 1852)

Zur Herstellung von Paprikapulver werden die Früchte nach der Ernte getrocknet und anschließend gemahlen. Dabei werden unterschiedliche Trocknungsverfahren angewandt. Die Lufttrocknung, beispielsweise unter der Sonne oder in Trocknungshallen, stellt ein einfaches Verfahren dar, hat jedoch meist einen Verlust an Aromen zur Folge (Belitz et al. 2013). Wegen der geringen Kosten und dem niedrigen Aufwand wird es am häufigsten in der Gewürzproduktion angewendet (Jin et al. 2017).

Ein teureres und aufwändigeres Verfahren stellt im Gegensatz dazu die Gefriertrocknung dar (Hamatschek 2016). Es gilt jedoch als besonders schonend, da es hier im Gegensatz zu thermischen Trocknungsverfahren nicht zu einer Denaturierung von Eiweißen und wegen des geringen Drucks nicht zu Oxidationsprozessen kommt (Neumann et al. 1955).

Die aus Ungarn stammende Einteilung der Handelsklassen in Paprika scharf, rosenscharf, halbsüß, edelsüß und Delikatesspaprika bezieht sich hauptsächlich auf die Schärfe des Gewürzes (Rimbach et al. 2015). Ausschlaggebend dafür ist, neben der Sortenwahl, auch die Verarbeitung. Je nach gewünschtem Schärfegrad werden mehr oder weniger Samen und innere Scheidewände mitgemahlen (Schormüller 2013). Der Schärfestoff Capsaicin wird nämlich hauptsächlich von den Scheidewänden und der Plazenta gebildet und verbreitet sich während der Reife bis in die Samen (Suzuki et al. 1984). Wegen seiner u.a. analgetischen und durchblutungsfördernden Eigenschaften findet das Alkaloid Capsaicin auch in der Medizin Verwendung (Reyes-Escogido et al. 2011).

Zusätzlich zu der Verwendung als reines Gewürz spielt Paprika auch in der Lebensmittelverarbeitung eine große Rolle, bedingt durch die färbenden, würzenden und schärfegebenden Eigenschaften. Auch zur Produktion von Paprika-Oleo-resion, einem Aroma- und Farbextrakt, werden die *Capsicum annuum* -Früchte verwendet (Berke et al. 2012).

Paprikapulver zählt neben Pfeffer und Ingwer zu den am häufigsten verwendeten Gewürzen in Deutschland mit einer Importmenge von 14.726 t Tonnen im Jahr 2018 (Gewürzindustrie 2018). Hergestellt wird das Gewürz u.a. in Spanien, Portugal, Zentraleuropa, China, Südafrika und den USA, jedoch ist Ungarn das wohl bekannteste Produktionsland (Berke et al. 2012).

Es ist bekannt, dass Gewürze und Kräuter als Naturprodukte und oft bodennah oder im Boden wachsende Pflanzen teilweise sehr hohe Keimbelastungen, auch mit pathogenen Erregern, aufweisen können (Schweiggert et al. 2007). Dies kann einen mikrobiellen Verderb des Produktes zur Folge haben und unter Umständen auch zu gesundheitlichen Schäden bei den Verbrauchern führen (Thanushree et al. 2019). Paprikapulver zeigte in mehreren Studien hohe Belastungen mit Mykotoxinen von Schimmelpilzen wie beispielsweise *Aspergillus niger* (Lema et al. 2018, Frimpong et al. 2019). Auch eine erhöhte Keimbelastung mit Salmonellen wurde mehrmals beschrieben und führte im Jahr 1993 zu einem landesweiten Salmonellenausbruch in Deutschland (Lehmacher et al. 1995). Als Auslöser für bakteriellen Verderb von Paprikafrüchten wurde das Bakterium *Pectobacterium carotovorum* isoliert (Gillis et al. 2017, Hua et al. 2020). Es verursacht eine Weichfäule der Paprikafrüchte und führte im Jahr 2011 in

Korea zu hohen Produktionseinbußen und daraus folgenden wirtschaftlichen Schäden (Choi et al. 2013). Ein Monitoring des BVL im Jahr 2017 ergab zudem, dass mehrere Paprikagewürzproben eine Belastung mit Pflanzenschutzmittelrückständen aufwiesen (BVL 2020). Bei 13 % der Proben überschritten diese sogar die Höchstgehalte.

2.1.4 Oregano

2.1.4.1 Taxonomie und Herkunft

Die Pflanzengattung *Origanum* aus der Familie der Lippenblütengewächse (Lamiaceae) umfasst circa 70 Arten, Unterarten, Varietäten und Hybriden (Ietswaart 1980, Kintzios 2002). Als Gewürz werden laut den Leitsätzen der DLMBK (1995) nur die Blätter, Blüten und obersten Stängel der Pflanzenart *Origanum vulgare* L., auch wilder Majoran oder echter Dost genannt, verstanden (s. Abbildung 4).

In vielen Ländern jedoch werden auch andere *Origanum*-Arten (z.B. *Origanum onites* L. = Türkischer Oregano) und teilweise sogar Pflanzen anderer Gattungen (z.B. *Lippia origanoides* K. = Mexikanischer Oregano) als Oregano bezeichnet und zum Würzen verwendet (Cid-Pérez et al. 2015).

Die Pflanzenart *Origanum vulgare* L. gliedert sich in sechs Unterarten (Ietswaart 1980) (Tabelle 3). Sie unterscheiden sich stark in ihrem Aroma und sind deshalb als Würzmittel mehr oder weniger gut geeignet (Buroh et al. 2008, Purle 2020). Der griechische Oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*) besitzt von allen Unterarten das intensivste Aroma. *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* hingegen zeichnet sich durch milderen Geschmack aus, verströmt jedoch einen starken aromatischen Duft und wird deswegen auch oft als Gartenpflanze eingesetzt (Purle 2020).

Tabelle 3: Einteilung und vermutliche Herkunft von *Origanum vulgare* nach Ietswaart (1980)

Subspezies	Herkunft
<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>vulgare</i>	Europa
<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>gracile</i>	Afghanistan, Iran, Türkei, Russland
<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>glandulosum</i>	Algerien, Tunesien
<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i>	Albanien, Kroatien, Griechenland, Türkei
<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>viridulum</i>	Afghanistan, Kroatien, Frankreich,
<i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>virens</i>	Marokko, Spanien

2.1.4.2 Herstellung und Verwendung

Oregano als Gewürz wird hauptsächlich in getrockneter Form vermarktet. Hierfür wird er kurz vor oder während der Blütezeit geerntet, zu Bündeln zusammengefasst und je nach Möglichkeit und klimatischen Bedingungen in Trocknungshallen oder an der Luft getrocknet (Kintzios 2002). Direkte Sonneneinstrahlung sollte bei der Trocknung vermieden werden, um das Aroma und die grüne Farbe zu erhalten (Makri 2002).

In der Küche wird Oregano zum Würzen von diversen Gerichten verwendet wie beispielsweise Fleisch, Salate, Eintöpfe oder Dressings. Auch ist es das wohl berühmteste Pizzagewürz (Kintzios 2002). Wegen seiner antioxidativen und antiseptischen Eigenschaften kann Oregano auch als Lebensmittelzusatzstoff für Mayonnaise oder French Dressing verwendet werden (Chipault et al. 1952, Nakatani et al. 1987, Baratta et al. 1998).



Abbildung 4: *Origanum vulgare* L. Illustration (Lindman 1922)

2.1.5 Pfeffer

2.1.5.1 Taxonomie und Herkunft

Der echte Pfeffer, der auch der König der Gewürze genannt wird, zählt zu den wichtigsten und meistverbreiteten Gewürzen der Welt (Parthasarathy et al. 2008). Es wird aus den reifen Früchten der Kletterpflanze *Piper nigrum* L. (Abbildung 5) aus der Familie der Piperaceae gewonnen und ist somit wie Paprika ein Fruchtgewürz (Ravindran 2005). Ursprünglich stammt der Pfeffer aus der indischen Region Malabar (heute der Bundesstaat Kerala) und wurde von arabischen und phönizischen Händlern als Gewürz nach Europa gebracht (Nabors 2007). Heutzutage wird er in vielen tropischen Gebieten u.a. auf Sri Lanka, Indonesien, Brasilien, Thailand, Vietnam oder Afrika kultiviert (Teubner et al. 2008).

Nicht zu verwechseln ist der echte Pfeffer mit anderen Sorten, wie dem schärferen Langen Pfeffer (*Piper longum* L.). Auch der Cayennepfeffer (*Capiscum frutescens* L.), ein scharfes Pulver aus gemahlenen Chilischoten, oder der aus Australien stammende Tasmanische Pfeffer (*Tasmannia lanceolata*) sind davon abzugrenzen (Steinecke 2016).

2.1.5.2 Herstellung und Verwendung

Die unterschiedlichen Farben der echten Pfefferkörner (schwarz, weiß, grün und rot) sind nicht bedingt durch Sortenunterschiede, sondern entstehen durch verschiedene Erntezeitpunkte und Produktionsschritte der gleichen Pflanze (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Spezifische Produktionsschritte der unterschiedlicher Pfeffersorten (Wenning et al. 2018)

„Pfeffersorte“	Reifegrad der Früchte	Spezifische(r) Produktionsschritt(e)
Schwarz	unreif	Langsame Trocknung
Weiß	reif	Einweichen in Wasser (ca. 1 Woche) Entfernung des Perikarps und Trocknung
Grün	unreif	Einlegen in Salzwasser oder Schnelle Trocknung bei hohen Temperaturen
Rot	reif	Einlegen in salzige oder saure Laken

Echter Pfeffer wird in ganzer oder gemahlener Form vermarktet und ist oft ein wesentlicher Bestandteil von Gewürzmischungen (Rimbach et al. 2015). Verwendet wird Pfeffer zum Würzen von diversen Speisen. Der typische scharfe Geschmack beruht dabei auf den Pflanzenbestandteilen Piperin, ätherischen Ölen und Oleoresin (Zachariah et al. 2008). Aber auch in der traditionellen Medizin spielt Pfeffer eine große Rolle u.a. wegen des Alkaloides Piperin (Butt et al. 2013). Dieser bioaktiven Substanz werden antiphlogistische, antimikrobielle und leber- und magenschützende Eigenschaften zugeschrieben (Capasso et al. 2002, Bang et al. 2009). Außerdem kann es die Bioverfügbarkeit einiger Medikamente wie beispielsweise Ibuprofen erhöhen (Venkatesh et al. 2011).



Abbildung 5: *Piper nigrum* L. Illustration (Pabst 1887)

2.2 Lebensmittelbetrug

2.2.1 Definition und rechtliche Grundlage

Lebensmittelbetrug wird als das „vorsätzliche Inverkehrbringen von Lebensmitteln mit der Absicht, durch Verbrauchertäuschung einen finanziellen Gewinn zu erzielen“ definiert (BfR 2016a). Dies wird entweder durch „unerlaubte Zusätze, die zu einer Änderung der Zusammensetzung des Lebensmittels führen“ oder „bewusste Falschdeklaration, d. h. die absichtliche Verwendung falscher oder das Weglassen von Angaben auf dem Etikett“ verursacht (BfR 2016a).

Bis heute existiert innerhalb der europäischen Mitgliedsstaaten noch keine einheitliche Definition des Begriffes Lebensmittelbetrug (engl.: *food fraud*) (BfR 2016a, Nöhle 2017). Dies ist dadurch begründet, dass jeder Staat der Europäischen Union (EU) nationale Rechtsverletzungen individuell definiert und handhabt (Stein et al. 2018). Den nationalen Auslegungen übergeordnet steht jedoch die Basisverordnung VO (EG) Nr. 178/2002. Dort sind die Prinzipien des Verbraucherschutzes innerhalb der EU festgelegt. So sind „... nach den allgemeinen Grundsätzen des EU- Lebensmittelrechts ... Betrugspraktiken, die Verfälschung von Lebensmitteln und alle sonstigen Praktiken, die den Verbraucher irreführen können, untersagt“ (EU-Parlament 2016). In den verschiedenen Definitionen der Länder finden sich jedoch immer drei wichtige Elemente des Lebensmittelbetrugs wieder: Vorsatz, Täuschung/Irrtum und unrechtmäßige Bereicherung/Vermögensvorteil (Saicon 2018). Damit lässt sich Lebensmittelbetrug, wie in Abbildung 6 ersichtlich, von den anderen drei Bereichen der Lebensmittelintegrität (Lebensmittelschutz, -sicherheit-, und -qualität) abgrenzen (Müller 2018).

In Deutschland ist Betrug gemäß § 263 Strafgesetzbuch (StGB) eine Straftat. Dahingegen ist die (arglistige) Täuschung ein unbestimmter Begriff des Zivilrechts und zählt als Ordnungswidrigkeit nach § 11 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB). Die Grenzen bei Lebensmittelbetrug sind fließend und im Einzelfall muss die Bewertung, ob bereits eine Straftat oder noch eine Ordnungswidrigkeit vorliegt, durch Juristen vorgenommen werden (Müller 2018).

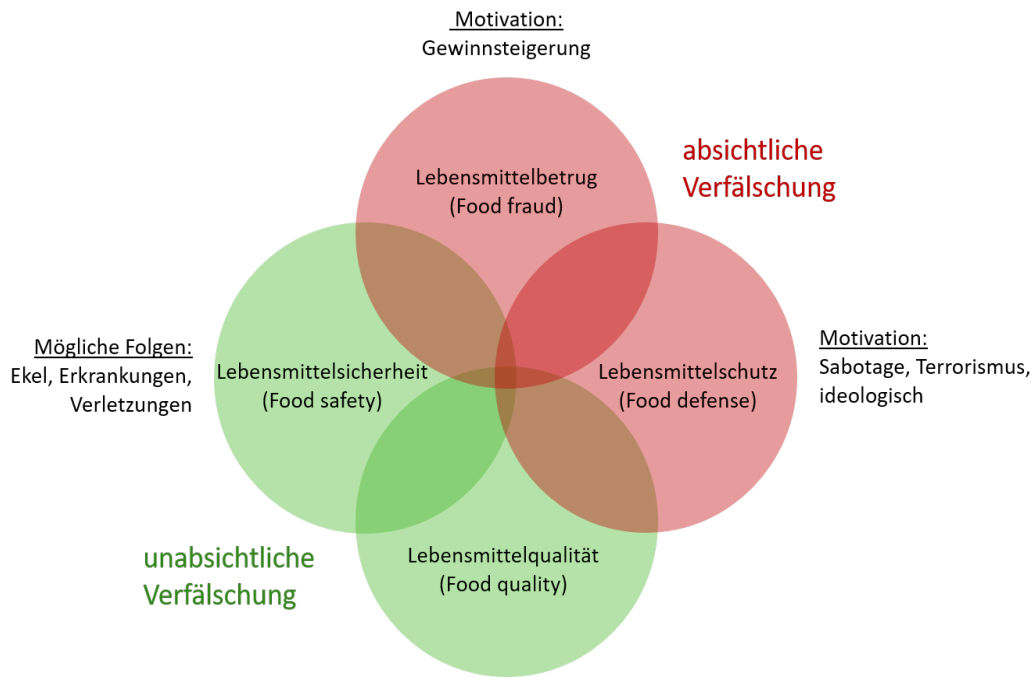


Abbildung 6: Die vier Komponenten der Lebensmittelintegrität nach Müller (2018)

Es gibt verschiedene Arten, wie Lebensmittel verfälscht werden können. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) unterscheidet folgende fünf Kategorien von Lebensmittelbetrug, die teilweise auch miteinander einhergehen (BfR 2016a):

1. Zusatz eines lebensmittelfremden - exogenen - Stoffes zur Streckung oder Vortäuschung einer besseren Qualität
2. Zugabe eines endogenen Stoffes zur Vortäuschung einer höheren Qualität oder zur Streckung
3. Verschnitt von unterschiedlichen - geographischen und/oder botanischen/tierischen - Herkünften ohne diesbezügliche Kennzeichnung
4. Anwendungen von nicht gekennzeichneten oder nicht erlaubten Herstellungsprozessen
5. Falschdeklaration: falsche Angaben oder Auslobungen auf dem Etikett

Die Motivation für Lebensmittelbetrug besteht immer in einer finanziellen Gewinnsteigerung, möglichst verbunden mit einem geringen Risiko (EMA, engl.: *economically motivated adulteration*) (Spink et al. 2011). Deshalb häufen sich Betrugsfälle u.a. dort, wo hohe Rohstoffpreise und lange undurchsichtige Handelswege vorherrschen (Galvin-King et al. 2018).

2.2.2 Maßnahmen gegen Lebensmittelbetrug

Wesentliche Bestandteile in der Bekämpfung des Lebensmittelbetruges sind die Früherkennung, ein ständiger Informationsaustausch und die zwischenbehördliche Zusammenarbeit auf nationaler und internationaler Ebene (Hoffbauer 2017). So folgte die Europäische Kommission nach dem Pferdefleischskandal 2013, dass es notwendig sei, nicht nur Lebensmittelaufsichtsdienste, sondern auch grenzübergreifend andere Behörden wie den Zoll, die Polizei und die Staatsanwaltschaft stärker in die Bekämpfung miteinzubeziehen (Europäische-Kommission 2014).

Der Informationsaustausch erfolgt hauptsächlich über elektronische Netzwerke, wie beispielsweise dem 2013 von der EU ins Leben gerufene „Food Fraud Network“ (FFN) (Hoffbauer 2017). Jeder EU-Mitgliedsstaat und auch Staaten der Europäischen Freihandelsassoziation (ETFA) wie die Schweiz, Norwegen und Island haben dafür jeweils einen sogenannten „Food Fraud Contact Point“ benannt (Europäische-Kommission 2018). Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) stellt die nationale Kontaktstelle in Deutschland dar (BfR 2016a). Über dieses Netzwerk können EU-Mitgliedsstaaten schnell Informationen austauschen und zusammen mit der europäischen Kommission und Europol grenzübergreifende Fälle bekämpfen und koordinieren (BVL 2018, Europäische-Kommission 2018).

Zu den Projekten, die zur Bekämpfung von Lebensmittelbetrug ins Leben gerufen wurden, gehört u.a. das *SPICED*-Projekt (deutsch: Sicherung der Gewürz- und Kräuterwarenketten Europas, 2013-2016), ein vom BfR koordiniertes und von der EU gefördertes Drittmittelprojekt (BfR 2016b). Dessen Ziel war der Schutz der gesamten Warenkette von der Primärproduktion bis zum Endprodukt. Dafür wurden u.a. laufend Risikoanalysen durchgeführt und geeignete Schnellnachweis- und Screeningverfahren zur Feststellung von Verfälschungen entwickelt (SPICED 2013).

Die Verbraucher und die Behörden erwarten aber auch von den Lebensmittelunternehmen, dass Maßnahmen zur Vermeidung und Aufdeckung von Lebensmittelbetrug ergriffen werden (Dorynek 2019). Auch deshalb steigt die Nachfrage nach verlässlichen und routinemäßig anwendbaren Analysemethoden zur Authentizitätskontrolle immer mehr an (Winter 2014).

2.2.3 Betrug bei Kräutern und Gewürzen

Kräuter und Gewürze gehören zu den am häufigsten verfälschten Lebensmitteln. Dies ist bedingt durch ihre teilweise sehr hohen Rohstoffpreise und durch die komplexen und oft grenzüberschreitenden Warenströme (Spink et al. 2011, Silvis et al. 2017, Galvin-King et al. 2018). Aber auch preiswertere Gewürze und Kräuter sind häufig Opfer von Verfälschungen, da hier der Profit wegen der hohen Nachfrage über die Menge gemacht werden kann (BVL 2017). Die Tatsache, dass sie meist in Pulverform gehandelt werden, erleichtert Betrugern insbesondere die unerkannte Beimengung von fremden Substanzen (Hong et al. 2017).

Neben Angebot und Nachfrage wird der Preis von Gewürzen u.a. auch durch die Intensivität ihrer Farbe, welche als Qualitätsmerkmal gilt, bestimmt (Black et al. 2016). Eine Verfälschung erfolgt deswegen häufig durch Zugabe von künstlichen Farbstoffen mit langer Haltbarkeit, um eine bessere Qualität vorzutäuschen (Khan et al. 2020). Im Jahr 2003 wurde festgestellt, dass mehreren Chili-Pulvern illegal der karzinogene Farbstoff Sudanrot beigemischt wurde, der dem Chilipulver eine intensivere rote Färbung verleihen sollte (Black et al. 2016). Dies stellte zusätzlich zum Lebensmittelbetrug auch eine von den Fälschern bedenkenlos in Kauf genommene Gefahr für die Lebensmittelsicherheit dar, was die Überschneidung der einzelnen Bereiche der Lebensmittelintegrität verdeutlicht (siehe Abbildung 6).

Eine weitere häufige Art des Lebensmittelbetruges bei Kräutern und Gewürzen stellt die vollständige oder teilweise Substitution des Rohstoffes mit anderen Substanzen, sogenannten Füllmaterialien, dar (Müller 2018). Diese können zur selben Pflanzenart gehören, besitzen jedoch meist weniger Aroma-, Farb- oder Wirkstoffe und sind zusätzlich billiger als das Originalgewürz. So wurde beispielsweise der echte Zimt (*Cinnamomum verum*) mit Zimtkassie (*Cinnamomum cassia*) verfälscht, welche qualitativ minderwertiger ist und mehr der schädlichen Substanz Cumarin beinhaltet (Osman et al. 2019). Auch wurden Gewürze wie z.B. der echte schwarze Pfeffer (*Piper nigrum* L.) aufgrund seiner äußerlichen Ähnlichkeit mit Pflanzenteilen einer komplett anderen Ordnung, wie in diesem Beispiel den Samen der Papayafrucht (*Carica papaya* L.), verfälscht (Pruthi et al. 1969).

Eine Übersicht der häufigsten Verfälschungen von Kräutern und Gewürzen ist in folgender Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Bekannte Verfälschungen von Kräutern und Gewürzen

Gewürz	Verfälschungsmittel	Referenz
Fenchel (<i>Foeniculum vulgare</i> L.)	Kreuzkümmel (<i>Cuminum cyminum</i> L.), Dill (<i>Anethum graveolens</i> L.)	Osman et al. (2019)
Kreuzkümmel (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	Erdnussschalen (<i>Arachis hypogaea</i> L.) Koriander (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	FDA (2015) Osman et al. (2019)
Kurkuma (<i>Curcuma longa</i> L.)	Zitwerwurzel (<i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe)	Sasikumar et al. (2004)
Oregano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	Gerber-Sumach (<i>Rhus coriaria</i> L.) Olivenblätter (<i>Olea europea</i> L.), Zistrosenblätter (<i>Cistus</i> spp.) Winter-Bohnenkraut (<i>Satureja montana</i>)	Marieschi et al. (2009) Hägele et al. (2019) Marieschi et al. (2011)
Paprika (<i>Capsicum annum</i> L.)	Tomatenschalen Weißer Pfeffer, Ziegelsteinstaub Mandelschalen, getrocknete rote Bete-Schnitzel	De (2003) Galvin-King et al. (2020) Dhanya et al. (2008)
Safran (<i>Crocus sativus</i> L.)	Färberdistel (<i>Carthamus tinctorius</i>) Kurkuma (<i>Curcuma longa</i> L.) Granatapfelfasern (<i>Punica granatum</i>) , Ringelblume (<i>Calendula officinalis</i>)	Hagh-Nazari et al. (2007) Petrakis et al. (2015) Heidarbeigi et al. (2015)
Schwarzer Pfeffer (<i>Piper nigrum</i> L.)	Papaya-Samen (<i>Carica papaya</i> L.) Buchweizenmehl oder Hirse Chili-Pulver (<i>Capsicum</i> sp.) Wandelröschen (<i>Lantana camara</i> L.), Peruanischer Pfefferbaum (<i>Schinus molle</i> L.)	Pruthi et al. (1969) ASTA (2004) Parvathy et al. (2014) Singhal et al. (1997)
Zimt (<i>Cinnamomum verum</i>)	Zimtkassie (<i>Cinnamomum cassia</i> L.)	Cantarelli et al. (2020)

2.2.4 Analytische Methoden zum Nachweis von Verfälschungen bei Kräutern und Gewürzen

Die Ansprüche an die Analytik für die Authentizitätskontrolle konzentrieren sich auf Schnelligkeit, Sicherheit und Praktikabilität der Verfahren (Lohumi et al. 2015). Die Analysearten sind vielfältig und richten sich u.a. nach der zu untersuchenden Pflanzenmatrix, aber auch nach der Art der Verfälschung: teilweise oder gänzliche Substitution, falsche Deklaration in Bezug auf die botanische oder geographische Herkunft (Gottschalk et al. 2018). Vor allem molekularbiologische, massenspektrometrische und spektroskopische Verfahren kommen derzeit zum Einsatz (Galvin-King et al. 2018). In Tabelle 6 ist eine kurze Übersicht über gängige Analyseverfahren, sowie Anwendungsbeispiele im Bereich der Verfälschungsdetektion bei Kräutern und Gewürzen dargestellt.

Tabelle 6: Beispiele für Analyseverfahren zum Nachweis von Verfälschungen bei Kräutern und Gewürzen

Analyseverfahren	Gewürz	Verfälschungsmittel	Referenz
Molekularbiologie:			
SCAR-PCR (sequence characterized amplified region-PCR)	Kurkuma	<i>Curcuma zedoaria</i> , <i>Curcuma malabarica</i>	Dhanya et al. (2011)
	Oregano	Olivenblätter	Marieschi et al. (2011)
DNA-Barcoding	Schwarzer Pfeffer	Chili	Parvathy et al. (2014)
	Safran	<i>Carthamus tinctorius</i> , Chrysanthemum x morifolium, <i>Zea mays</i> , <i>Nelumba nucifera</i>	Huang et al. (2015)
Massenspektrometrie (MS):			
LC-MS/MS (Flüssigkeitschromatographie-MS)	Oregano/Salbei	Olivenblätter	Bononi et al. (2012)
GC-MS (Gaschromatographie MS)	Safran	Färberdistel	Farag et al. (2020)
PS-MS (Paper Spray MS)	Chili	Sudanfarbstoffe	Taverna et al. (2013)

Spektroskopie:

FT-NIR-Spektroskopie (Fourier-Transform- Nahinfrarotspektroskopie)	Paprika	Tomatenschalen	Galaxy-Scientific (2016)
	Schwarzer Pfeffer	Maniok, Mehl	de Lima et al. (2020)
Raman-Spektroskopie	Zwiebelpulver	Stärke	Lee et al. (2015)
NMR-Spektroskopie (Kernspinresonanzspektroskopie)	Paprika	Sudanfarbstoff	Hu et al. (2017)

2.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

2.3.1 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysemethode, bei der aus organischen und/oder anorganischen Substanzen gasförmige Ionen erzeugt werden. Diese werden anschließend nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt und können qualitativ und quantitativ erfasst werden (Harris et al. 2014).

Die Ionisationsverfahren sind zahlreich. Moleküle werden u.a. durch Elektronen, Photonen oder elektronisch angeregte Atome ionisiert (Ehlers 2003). Das Grundprinzip, nach dem alle Massenspektrometer aufgebaut sind, ist jedoch immer gleich. Sie bestehen aus einer Ionenquelle (*ion source*), einem Massenanalysator (*mass analyzer*) und einem Detektor (*detector*) (Gross et al. 2012).

2.3.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die MALDI-MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation) geht auf Arbeiten von Karas und Hillenkamp Ende der 80er Jahre zurück (Gey 2008). Es beschreibt ein sanftes Ionisierungsverfahren (*soft ionisation*), bei dem die zu untersuchende Probe in einer Matrix eingebettet ist und mittels eines Laserimpulses angeregt wird. Dadurch wird im Gegensatz zur *hard ionisation* eine Fragmentierung der Probenmoleküle verhindert (Hillenkamp et al. 2013). Deswegen wird dieses Verfahren auch zur Bestimmung von größeren Molekülen, wie Peptiden, Proteinen und Polymeren erfolgreich eingesetzt (Bahr et al. 1992, Danis et al. 1992). Die TOF (*time of flight*, Flugzeitanalyse) ist ein Verfahren, bei dem die Masse der Ionen über deren Flugzeit von der Ionenquelle zum Detektor ermittelt wird (Pareige et al. 2016). Der große Vorteil der TOF-MS ist die mikrosekundenschnelle Generierung kompletter Massenspektren in einem nahezu unbegrenzten Massenbereich (Schlag 2012). Durch die Abbildung aller ionisierbaren Bestandteile einer Probe können so z.B. Peptid- oder Proteinfingerprintspektren mittels MALDI-TOF MS generiert und verglichen werden (Elssner et al. 2011).

Die Funktionsweise von MALDI beruht auf der Ko-Kristallisation von Matrix- und Probenmolekülen. Dafür wird die Probe auf die MALDI-Probenplatte (Target) aufgetragen und mit einer niedermolekularen organischen Matrix überschichtet. Während der Trocknung ko-kristallisiert die Matrix aus und bettet die Analyten ein (Schubert et al. 2011).

Eine schematische Darstellung der Ionisation ist in Abbildung 7 dargestellt. Laserimpulse führen zu einer Anregung bzw. explosionsartigen Ablösung von Teilchen (Desorption). Die durch den Laserbeschuss entstehende Energie wird von der Matrix absorbiert und in Form von Protonen auf die Probenmoleküle übertragen (Hillenkamp et al. 2007). Wie genau diese Energieübertragung jedoch funktioniert, ist bis heute nicht vollständig geklärt.

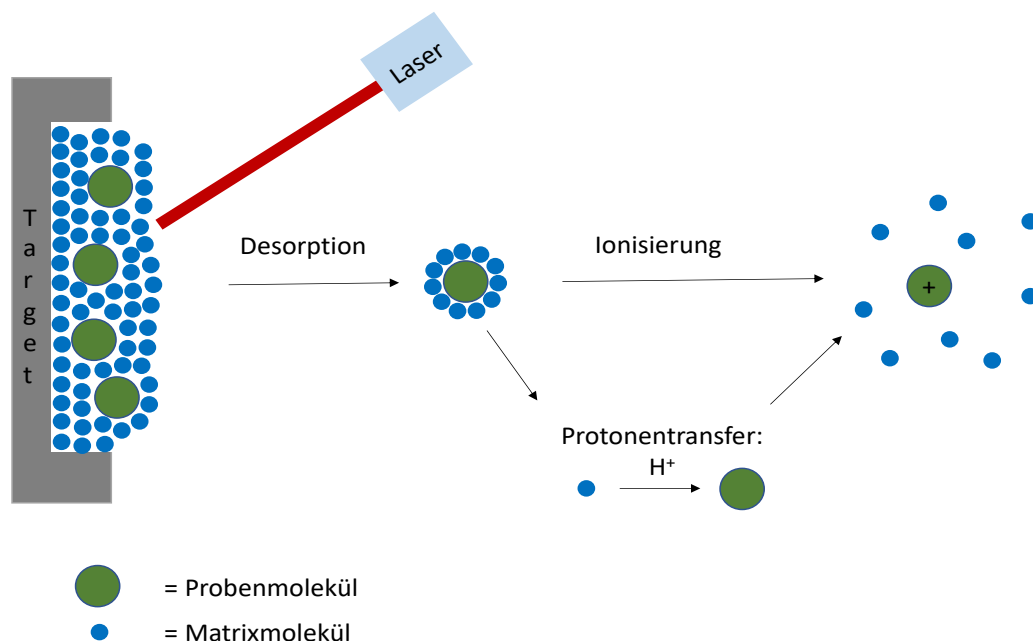


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ionisationsvorgangs nach Šebela (2016)

Die verwendete Matrix muss mehrere Eigenschaften erfüllen. Zum einen müssen sowohl die Proben- als auch die Matrixmoleküle darin lösbar sein (*solubility*). Außerdem muss sie die Energie des Lasers absorbieren können (*absorption*). Reaktive Matrices, die beispielsweise Proteine oder andere Analyten modifizieren oder oxidative Eigenschaften haben, sind nicht verwendbar, da sie die Ergebnisse verfälschen können (Beavis 1992).

Es gibt eine Vielzahl an eingesetzten Matrices, welche zu einem großen Teil auf aromatischen Carbonsäuren basieren. Je nach Probenmaterial muss entschieden oder ausprobiert werden, welche Matrix sich eignet (Gross 2019). Eine vielseitig eingesetzte Matrix ist beispielsweise die α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure (HCCA) (Beavis et al. 1992).

Im Anschluss an die Ionisierung werden die geladenen Probenmoleküle durch ein Ladungsgefälle im Vakuum in Richtung Detektor beschleunigt. Nach Passage durch ein geerdetes Gitter, befinden sie sich auf einer feldfreien Drift-Strecke und besitzen alle die gleiche kinetische Energie (Wolf 1996). Der Zeitpunkt, wann sie am Detektor ankommen, hängt somit nur von ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) ab, wobei größere Moleküle länger und kleinere Moleküle kürzer brauchen, um auf dem Detektor aufzutreffen. Durch diese Flugzeit kann mittels EDV-gestützter Prozessierung dann die Masse als m/z –Verhältnis angegeben werden.

Das so generierte Massenspektrum (*mass spectrum*) gibt die Signalintensität (y-Achse) und die m/z (x-Achse) der detektierten Ionen an. Die Intensität eines Massenpeaks entspricht gleichzeitig der Häufigkeit des gemessenen Ions (Gross et al. 2012). Nachfolgende Abbildung 8 zeigt ein Massenspektrum eines Kalibrationsstandards.

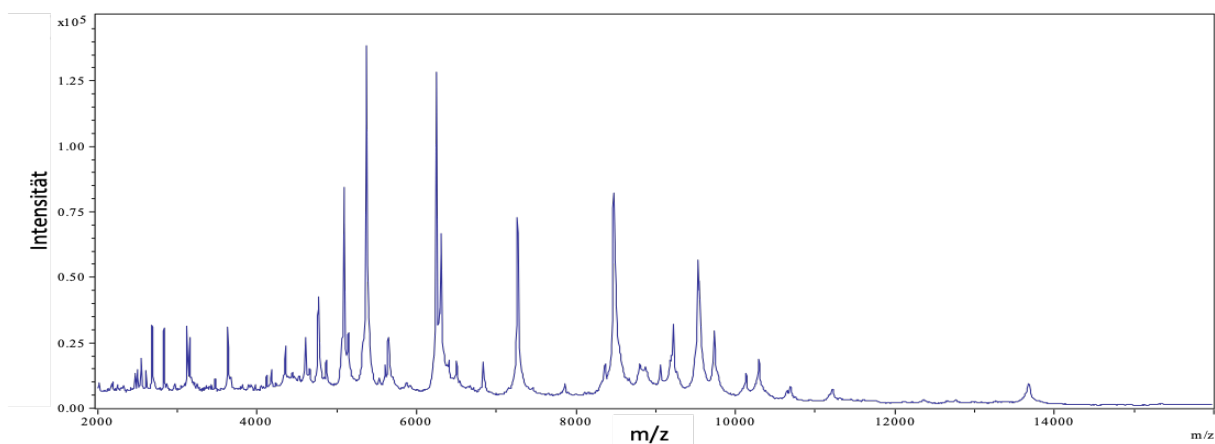


Abbildung 8: MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) des Bacterial Test Standards der Firma Bruker

Häufig besitzen Massenspektren einen unspezifischen Signaluntergrund, auch als „Rauschen“ bezeichnet, das durch Störsubstanzen in den Proben ausgelöst wird. Das Signal-zu-Rausch Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, S/N) beschreibt das Verhältnis von der Signalthöhe eines Peaks zur Höhe des Rauschens (Gross et al. 2012). Je nachdem wie groß das Rauschen ist, können eigentliche spezifische Massenpeaks darin untergehen, weswegen nur Peaks ab einem bestimmten S/N -Verhältnis tatsächlich von analytischer Relevanz sein können (Liebscher 2014).

2.3.3 Einsatzbereiche

Die Anwendungsbereiche der MALDI-TOF MS sind mittlerweile sehr vielfältig. Neben dem Einsatz in der mikrobiologischen Routinediagnostik wird sie u.a. auch auf den Gebieten der klinischen Chemie, der Proteomforschung und der Lebensmittelanalytik angewandt (Rau et al. 2021). Beispiele für Anwendungsmöglichkeiten sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Einsatzbereiche und Anwendungsbeispiele der MALDI-TOF MS

Einsatzbereich	Anwendungsbeispiele	Quelle
Mikrobiologische Diagnostik	Identifizierung von Bakterien und Sprosspilzen aus Nährmedien	Schubert et al. (2011)
	Direktnachweis und Differenzierung von pathogenen Mikroorganismen aus Patientenproben (Urin und Blut)	Ferreira et al. (2011)
	Nachweis von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien	Idelevich et al. (2018)
Klinische Chemie	Identifizierung und Charakterisierung spezifischer Biomarkern bei Tumorerkrankungen, Morbus Alzheimer, Allergien oder Rheuma	Marvin et al. (2003)
	Urinuntersuchungen zum Nachweis einer Albuminurie	Shiea et al. (2008)
	Blutscreening von Neugeborenen zur Diagnose der Sichelzellkrankheit	Hachani et al. (2011)
	Haaranalysen zum Nachweis von Kokain und Metoxiphenamin	Miki et al. (2011), Porta et al. (2011)
Lebensmittelanalytik	Identifizierung lebensmittelrelevanter Mikroorganismen	Pavlovic et al. (2011)
	Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln (Fleisch, Fisch, Milch, Käse und Insekten)	Cozzolino et al. (2002), Calvano et al. (2012), Flaudrops et al. (2015), Fuchs et al. (2017), Ulrich et al. (2017)
	Bestimmung der geographischen Herkunft von Honig	Wang et al. (2009)

Bei der Verwendung der MALDI-TOF MS kann zwischen zielgerichteter (targeted) und nicht zielgerichteter (non-targeted) Analyse unterschieden werden (Duncan et al. 2016). Bei ersteren werden einzelne Moleküle wie Protein-Biomarker u.a. durch sogenanntes *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) identifiziert (Webster et al. 2005).

Bei der nicht-zielgerichteten Analyse werden komplexe biologische Proben, beispielsweise Bakterien oder Pilze, anhand ihres individuellen molekularen Fingerabdruckes identifiziert (Anhalt et al. 1975, Chalupová et al. 2014). Das sogenannte *profiling* nimmt vor allem in der Routinediagnostik einen hohen Stellenwert ein (Schubert et al. 2011). Bakterien- oder Pilzkulturen werden zunächst mittels MALDI-TOF MS gemessen. Die so generierten Massenspektren geben das jeweils einzigartige Proteinprofil der Organismen wieder. Durch Abgleich dieser Massenspektren (*fingerprints*) mit Referenzspektren, die in einer Datenbank hinterlegt sind, ist es möglich mittels eines Algorithmus unbekannte Bakterien bis zur Subspezies-Ebene hin zu identifizieren (Yang 2013). Auch in der Authentizitätskontrolle von Lebensmitteln wurde das Prinzip des *profilings* mittels MALDI-TOF MS erfolgreich zur Tierartendifferenzierung von Fleisch, Milch oder Fisch angewandt (Calvano et al. 2012, Flaudrops et al. 2015, Fuchs et al. 2017).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Pflanzliches Untersuchungsmaterial

Alle verwendeten pflanzlichen Materialien sind in den folgenden Tabellen 8-11 zusammengefasst und nach ihrer Verwendung im Rahmen der Untersuchungen gegliedert.

Tabelle 8: Für die Untersuchungen verwendete Paprikaproben (*Capsicum* sp. L.)

Probe	Bezugsquelle	Herkunft	Erwerbsjahr
Methodenoptimierung			
Bio Spitzpaprika (frisch)	Vollcorner, München	Deutschland	2018
Erstellung von Referenzspektren			
Gewürzpaprika (ganz, getrocknet)	RAPS GmbH, Kulmbach	Deutschland	2018
Gewürzpaprika (ganz, getrocknet)	RAPS GmbH, Kulmbach	Deutschland	2018
Gewürzpaprika (ganz, getrocknet)	Chili Pepper Trade Manufactory Ltd., Ungarn	Ungarn	2018
Gewürzpaprika (ganz, getrocknet)	Ungarische Spezialitäten, Sülzetal	Ungarn	2018
Gewürzpaprika (ganz, getrocknet)	Ungarische Spezialitäten, Sülzetal	Ungarn	2019
Bestimmung von Einflussfaktoren			
Bio Spitzpaprika (frisch)	HIT-Supermarkt, Oberschleißheim	Spanien	2019
Gewürzpaprika (ganz, getrocknet)	RAPS GmbH, Kulmbach	Deutschland	2018
Chili 1 (frisch)	Trübenecker / Viktualienmarkt München	unbekannt	2019
Chili 2 (frisch)	Trübenecker / Viktualienmarkt München	unbekannt	2019
Peperoni (frisch)	Trübenecker / Viktualienmarkt München	unbekannt	2019
Habanero (frisch)	Trübenecker / Viktualienmarkt München	unbekannt	2019
Jalapeño (frisch)	Trübenecker / Viktualienmarkt München	unbekannt	2019

Tabelle 9: Für die Untersuchungen verwendete Oreganoproben

Probe	Bezugsquelle	Herkunft	Erwerbsjahr
Methodenoptimierung			
Oreganopflanze (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> L.)	Gartencenter Seebauer KG, München	Italien	2019
Erstellung von Referenzspektren			
Oreganopflanze (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> L.)	Naturkräutergarten, Kleinich	Deutschland	2019
Oreganopflanze (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> L.)	Gartencenter Seebauer KG, München	Italien	2019
Oreganopflanze (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> L.)	Dehner GmbH & Co. KG, München	Italien	2019
Oreganopflanze (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> L.)	Dehner GmbH & Co. KG, München	Italien	2019
Oreganopflanze (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> L.)	Kräuter und Duftpflanzen, Horstedt	Deutschland	2020
Bestimmung von Einflussfaktoren			
Oreganopflanze (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> L.)	Kräuter und Duftpflanzen, Horstedt	Deutschland	2020
Oreganopflanze (<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> L.)	Kräuter und Duftpflanzen, Horstedt	Deutschland	2020
Oreganopflanze (<i>Origanum onites</i> L.)	Kräuter und Duftpflanzen, Horstedt	Deutschland	2020
Oreganopflanze (<i>Lippia origanoides</i> K.)	Kräuter und Duftpflanzen, Horstedt	Deutschland	2020

Tabelle 10: Für die Untersuchungen verwendete Pfefferproben (*Piper nigrum* L.)

Probe	Bezugsquelle	Herkunft	Erwerbsjahr
Methodenoptimierung:			
Pfeffer schwarz	Gewürz Mayer GmbH, Stuttgart	Sri Lanka	2019
Erstellung von Referenzspektren:			
Pfeffer weiß	Gewürz Mayer GmbH, Stuttgart	Sri Lanka	2019
Pfeffer schwarz	Gewürz Mayer GmbH, Stuttgart	Sri Lanka	2019
Pfeffer schwarz	STAMER GmbH, Hamburg	Ecuador	2016
Pfeffer schwarz	STAMER GmbH, Hamburg	Vietnam	2016
Pfeffer schwarz	STAMER GmbH, Hamburg	Brasilien	2016
Pfeffer schwarz	STAMER GmbH, Hamburg	Brasilien	2016

Tabelle 11: Für die Untersuchungen verwendete Verfälschungsmittelproben

Probe	Bezugsquelle	Herkunft	Erwerbsjahr
Tomaten (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Eurogroup Espana S.A.	Spanien	2019
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	Vollcorner, München	unbekannt	2019
Olivenblätter (<i>Olea europaea</i>)	Verbena, Berlin	Spanien	2018

Die in Tabelle 12 aufgelisteten Handelsproben/Realproben stammen bis auf fünf Paprikaproben von der Firma RAPS GmbH, Kulmbach aus den Jahren 2018-2019. Die Paprikaproben Nr. 6-10 wurden von regionalen Supermärkten bezogen (2020).

Tabelle 12: Untersuchte Gewürz-Handelsproben von Paprika, Oregano und Pfeffer mit Angabe der Herkunft (falls bekannt)

Nr.	Paprika		Oregano		Pfeffer	
	Bezeichnung	Herkunft	Bezeichnung	Herkunft	Bezeichnung	Herkunft
1	Paprikapulver	Peru	Oregano	Deutschland	Pfeffer weiß	Sri Lanka
2	Paprikapulver	Peru	Oregano	Deutschland	Pfeffer weiß	Sri Lanka
3	Paprikapulver	Peru	Oregano	Ungarn	Pfeffer weiß	Sri Lanka
4	Paprika edelsüß	Ungarn	Oregano	Chile	Pfeffer weiß	Sri Lanka
5	Paprika edelsüß	Ungarn	Oregano	Griechenland	Pfeffer schwarz	Sri Lanka
6	Paprika edelsüß	-	Oregano	Griechenland	Pfeffer schwarz	Sri Lanka
7	Paprika edelsüß	-	Oregano	Türkei	Pfeffer schwarz	Indien
8	Paprika edelsüß	-	Oregano	Türkei	Pfeffer schwarz	Indien
9	Paprika rosenscharf	-	Oregano	Türkei	Pfeffer schwarz	Vietnam
10	Paprika rosenscharf	-			Pfeffer schwarz	Sri Lanka

3.1.2 Probenvorbereitung, Extraktion und Bestimmung von Einflussfaktoren

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Probenvorbereitung, Extraktion und Bestimmung von Einflussfaktoren sind in den folgenden Tabellen 13 und 14 aufgelistet. Das in dieser Arbeit verwendete Reinstwasser wurde am Lehrstuhl mittels in Tabelle 13 genannter Reinstwasseranlage“ Ultra Clear“ von Evoqua hergestellt.

Tabelle 13: Verwendete Gräte für die Probenvorbereitung, Extraktion und Bestimmung von Einflussfaktoren

Gerät	Firma	Artikelnummer
Feinwaage Sartorius Analytic	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen	40010142
Gefriertrocknung Berrytec CTFD-10-PT	Berrytec GmbH, Grünwald	15070100210P068
Horizontalschüttler Typ 3005	GFL, Burgwedel	10566514E
Kugelmühle, Retsch GmbH	Retsch GmbH, Haan	62624
Laborzentrifuge 3 K 12	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz	28210
Microcentrifuge - ScanSpeed Mini	LaboGene, Dänemark	7.601.314.101
Pipette Eppendorf Research 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg	10724165
Pipette Eppendorf Research 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg	3120000062
Pipette Eppendorf Research 20-200µl	Eppendorf AG, Hamburg	3120000054
Pipette Eppendorf Research 500-5000µl	Eppendorf AG, Hamburg	3120000070
Reinstwasseranlage Ultra Clear TP UV UF TM	Evoqua Water Technologies, Barsbüttel	W3T360166
TissueLyser Qiagen	Retsch GmbH, Haan	85220
Trockenschrank	Binder GmbH, Tuttlingen	18115300002020
Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik, Staufen	625025
Ultraschallbad RK 510	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin	327.00020793.001
Ultrazentrifugalmühle ZM 200	Retsch GmbH, Haan	20.823.0001
Vortex, Lab Dancer	IKA Labortechnik, Staufen	0003365000

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien für die Probenvorbereitung, Extraktion und Bestimmung von Einflussfaktoren

Verbrauchsmaterial	Firma	Artikelnummer
Aceton (p.a.)	Merck KGaA, Darmstadt	100014
Acetonitril-Chemsolute	Th. Geyer GmbH & Co KG., Renningen	2697.2500
Ameisensäure 99-100 % Chemsolute	Th. Geyer GmbH & Co KG., Renningen	2694-1011
Ammoniumacetat zur Analyse EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt	1.01116.1000
Becherglas 100 ml	VWR Internat. GmbH, Darmstadt	213-1122
Becherglas 250 ml	VWR Internat. GmbH, Darmstadt	213-1124
Dimethylsulfoxid (p.a.)	Merck KGaA, Darmstadt	1.02952.1000
Eppendorf Quality™-Eppendorf Safe-lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg	0030120.086
Eppendorf Quality™-Eppendorf Safe-lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg	0030 120.094
Ethanol absolut zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1009832511
Glasperlen 0,5 mm Durchmesser	Bio-Spec Products, Karlsruhe	11079105
Methanol (LC-MS grade)	Th. Geyer GmbH & Co KG., Deutschland	1481.2500
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	Sarstedt AG & Co KG., Nümbrecht	70.1130.600
Pipettenspitzen epT.I.P.S. 5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg	0030000978
Pipettenspitzen TipOne® 1000 µl	STARLAB International GmbH, Hamburg	S1111-6001
Pipettenspitzen TipOne® 200 µl	STARLAB International GmbH, Hamburg	S1113-1206
Trichloressigsäure (p.a.)	Merck KGaA, Darmstadt	1008070250
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Isolab Laborgeräte GmbH, Wertheim	0777693

3.1.3 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Alle Messungen wurden an einem Bruker Autoflex Speed MALDI TOF/TOF Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik GmbH Bremen durchgeführt. In folgenden Tabellen 15 und 16 sind alle verwendeten Softwares, weitere Geräte und Verbrauchsmaterialien für die MALDI-TOF MS Messung aufgeführt.

Tabelle 15: Verwendete Software zur MALDI-TOF MS Messung und Bearbeitung der Spektren

Software	Firma	Version
FlexControl	Bruker Daltonik GmbH, Bremen	3.4
FlexAnalysis	Bruker Daltonik GmbH, Bremen	3.4
MALDI Biotyper Compass Explorer	Bruker Daltonik GmbH, Bremen	4.1
ClinPro Tools	Bruker Daltonik GmbH, Bremen	3.0

Tabelle 16: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die MALDI-TOF MS Messung

	Firma	Artikelnr.
Geräte:		
MTP 384 polished Steel BC Target	Bruker Daltonik GmbH, Bremen	8280761
Vortex, Lab Dancer	IKA Labortechnik, Staufen	0003365000
Microcentrifuge - ScanSpeed Mini	LaboGene, Dänemark	7.601.314.101
Pipette Eppendorf Research 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg	10724165
Verbrauchsmaterialien:		
Acetonitril-Chemsolute	Th. Geyer GmbH & Co KG., Renningen	2697.2500
Bruker IVD Bakterien Test Standard	Bruker Daltonik GmbH, Bremen	8290190
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	Sarstedt AG & Co KG., Nümbrecht	70.1130.600
Trifluoressigsäure	Avantor Performance Materials B.V., Niederlande	0000040096
α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	476870-10G

3.1.4 Mikrobiologische Untersuchungen

In Tabelle 17 sind die zwei verwendeten Isolate von *Aspergillus niger* und *Pectobacterium carotovorum* aufgelistet. Das *Pectobacterium carotovorum* wurde in einer vorangegangenen Studie des Lehrstuhls aus einer Zuckermelone isoliert (Esteban-Cuesta et al. 2018). Verwendete Nährmedien, Verdünnungsflüssigkeit und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 18 und 19 aufgeführt.

Tabelle 17: Verwendete Isolate mit Angaben der Herkunft und Bestätigungsmethode

ID	Bezeichnung	Herkunft	Bestätigungsmethode
A 47	<i>Aspergillus niger</i>	MUVA Kempten (2018)	MALDI (Score Value 2,38)
1541	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Zuckermelone (Cantaloupe) (2015)	MALDI (Score Value: 2,22)

Tabelle 18: Verwendete Nährmedien und Verdünnungsflüssigkeit mit Angaben zur Herstellung

Nährmedium	Mischungsverhältnis	Bezugsquelle + Artikelnummer
Malz Extrakt Agar plus Novobiocin (MEA+)	48 g MEA ad 1 L Aqua dest. 125 mg Nov	Merck KGaA, Darmstadt (1053980500) Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe (J60928)
Plate Count Agar (PC)	22,5 g PC-Agar ad 1 L Aqua dest.	Merck KGaA, Darmstadt (105463)
Verdünnungsflüssigkeit	1 g Pepton aus Fleisch + 8,5 g Natriumchlorid ad 1 L Aqua dest.	Merck KGaA, Darmstadt (1072141000) Merck KGaA, Darmstadt (1064040500)

Tabelle 19: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien für die mikrobiellen Untersuchungen

	Firma	Artikelnr.
Geräte:		
Vortex-Mixer scientifica	VELP scientifica, Italien	12505
Gasbrenner Fireboy S1000	Ibs Tecnomora GmbH, Fernwald	8901C767
Stomacher Bagmixer	Interscience, Frankreich	50615704
Brutschrank Heraeus Klasse 3.1	Heraeus Holding GmbH, Hanau	51006848
Pipette Eppendorf Research 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg	10724165
Pipette Eppendorf Research 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3120000062
Pipette Eppendorf Research 20-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg	3120000054
Verbrauchsmaterialien:		
Becherglas 350 ml	VWR Internat. GmbH, Darmstadt	2131124
Cellulose-Stopfen	VWR Internat. GmbH, Darmstadt	391-0391
Drigalski-Spatel, Edelstahl	Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe	AL98.1
Eppendorf Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg	0030120086
Erlenmeyer Kolben 100 ml, Weithals	VWR Internat. GmbH, Darmstadt	2141171
Ethanol absolut zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1009832511
Impfösen Platin—Iridium 3mm	Zefa GmbH, Grasbrunn	33 31 00003
Impfösenhalter 240 mm	Zefa GmbH, Grasbrunn	33 31 86442
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	Sarstedt AG & Co KG., Nümbrecht	70.1130.600
Pipettenspitzen 1000 µl	STARLAB Internat. GmbH, Hamburg	S1111-6001
Pipettenspitzen 200 µl	STARLAB Internat. GmbH, Hamburg	S1113-1206
Reagenzglas, gerader Rand 130 mm	VWR Internat. GmbH, Darmstadt	2120318
Stomacherbeutel mit Filter	VWR Internat. GmbH, Darmstadt	129-0733
Natriumchlorid (NaCl) zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt	1.06406.0500

3.2 Methoden

3.2.1 Entwicklung und Optimierung der Extraktionsmethoden

Für die drei ausgewählten Matrices Paprika, Pfeffer und Oregano wurden unterschiedliche Extraktionsmethoden entwickelt und hinsichtlich der Probenmenge und der Reinigungs- und Extraktionsverfahren optimiert. Die Beurteilung der sich ergebenden Spektren bezüglich ihrer Qualität und Reproduzierbarkeit erfolgte jeweils anhand der Evaluierung der Anzahl der Massen mit einem Signal-zu-Rauschverhältnis (S/N Verhältnis) > 3 , der relativen Standardabweichung (RSD) der Massenzahlen als Maß für die Reproduzierbarkeit der Massenspektren, sowieso der S/N -Verhältnisse der jeweils 5 intensivsten Peaks. Diese Variablen wurden bereits in vergangenen Studien als Qualitätskriterien für die Beurteilung von MALDI-TOF MS Spektren eingesetzt (Williams et al. 2003, Wetzel et al. 2006, Drevinek et al. 2012). In dieser Arbeit wurden möglichst viele spezifische Massen mit einer RSD von unter 10 % und ein höchstmögliches S/N Verhältnis angestrebt.

Alle Proben, bis auf die bereits gemahlenen Gewürze, wurden vor Ihrer Verwendung mittels einer Kugelmühle (Pfeffer) bzw. einer Zentrifugalmühle (alle anderen Gewürze) zu feinem Pulver vermahlen. Alle frischen Materialien wurden zuvor für eine Woche im Trockenschrank bei 30 °C getrocknet, oder bei einem sehr hohen Wassergehalt gefriergetrocknet (Spitzpaprika). Alle folgenden Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt und jedes Replikat jeweils dreimal auf ein MALDI-Target gespottet (drei biologische und drei technische Replikate). Zentrifugationsschritte erfolgten immer für 5 Minuten bei 12000 U/min bei 4 °C. Das Mischen der Proben wurde mittels Vortex-Lab-Dancer für jeweils 30 Sekunden durchgeführt. Die Trocknung der Proben, beispielsweise nach Waschschritten, erfolgte für ca. zwei Stunden bei Raumtemperaturen zwischen 20 und 23 °C.

Alle Matrices wurden zunächst mit einem Gemisch aus Reinstwasser, Acetonitril und Ameisensäure (70 %) im Verhältnis 1:1:1 extrahiert. Dieses Verfahren (**Methode A**) wurde dann, wie in den folgenden Kapiteln im Einzelnen beschrieben, weiterentwickelt. 20 mg gemahlene Probe wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit 500 µl Reinstwasser auf einem Horizontalschüttler (500 rpm, 20 min) geschüttelt. Zu diesem Proben-/Wassergemisch wurden je 500 µl Ameisensäure (70 %) und Acetonitril hinzugefügt und gemischt. Die Proben wurden zentrifugiert und zur Messung eingesetzt (s. 3.2.2).

3.2.1.1 Paprika

Als Matrix für die Entwicklung der Extraktionsmethode wurde frische Spitzpaprika inkl. der Samen verwendet. Diese wurde für 5 Tage gefriergetrocknet und anschließend zu feinem Pulver vermahlen.

3.2.1.1.1 Waschen der Paprika mit verschiedenen Waschlösungen

Die Paprikaproben wurden zunächst mit verschiedenen Lösungsmitteln gewaschen, um Störsubstanzen, die die Analyse beeinflussen können, zu entfernen.

In unterschiedlichen Ansätzen wurden 20 mg Paprika in 2 ml Reaktionsgefäßen eingewogen und mit je 1 ml Ethanol, Aceton, Methanol oder Trichloressigsäure (TCA)/Aceton (1/9, *volume per volume* (v/v)) versetzt. Nach dem Mischen wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das resultierende Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, danach mit je 500 µl Wasser, Acetonitril und Ameisensäure (70 %) versetzt und gemischt. Nach anschließender Zentrifugation wurde je 1 µl von dem Überstand zur Messung eingesetzt (vgl. 3.2.2). Die verschiedenen Waschlösungskombinationen mit genannten Lösungsmitteln wurden in drei Untersuchungen getestet (s. Tabelle 20). Mehr als drei Waschschrte wurden nicht durchgeführt, um die Abtrennung zu vieler charakteristischer Substanzen zu vermeiden.

Tabelle 20: Verwendete Waschlösungskombinationen zur Abtrennung von Störsubstanzen von Paprika

Test	1. Waschschrte	2. Waschschrte	3. Waschschrte
1	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol • Aceton • Trichloressigsäure/Aceton (1/9, v/v) • Methanol 	X	X
2	Trichloressigsäure/Aceton (1/9, v/v)	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol • Aceton • Methanol 	X
3	Trichloressigsäure/Aceton (1/9, v/v)	Methanol	<ul style="list-style-type: none"> • Aceton • Ethanol

3.2.1.1.2 Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

Um das ideale Volumenverhältnis der Extraktionsmittel zu ermitteln, wurden in mehreren Ansätzen 20 mg Paprikapulver zuerst mit je 1 ml TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die resultierenden Pellets wurden mit verschiedenen Verhältnissen Reinstwasser, Acetonitril und Ameisensäure (70 %) versetzt, das Gesamtvolumen betrug immer 1,5 ml (s. Tabelle 21). Die Proben wurden durchmischt, zentrifugiert und je 1 µl des Überstandes zur Messung eingesetzt (vgl. 3.2.2).

Tabelle 21: Variation der Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

Test	Reinstwasser [µl]	Acetonitril [µl]	Ameisensäure (70 %) [µl]
A	500	500	500
B	-	1000	500
C	250	750	500
D	750	250	500
E	1000	-	500
F	-	500	1000
G	250	500	750
H	750	500	250
I	1000	500	-
J	500	-	1000
K	500	250	750
L	500	750	250
M	500	1000	-

3.2.1.1.3 Variation der Probeneinwaage

Ein wichtiges Kriterium für die Erstellung von qualitativ hochwertigen Spektren ist das richtige Verhältnis von Proben- zu Matrixmolekülen. Um dieses zu ermitteln, wurde in vier Ansätzen Paprikapulver eingewogen (10, 20, 50 und 100 mg) und jeweils dreimal mit den Lösungsmitteln TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton gewaschen. Nach der Trocknung der Proben bei Raumtemperatur wurden je 500 µl Ameisensäure (70 %), Acetonitril und Reinstwasser hinzugefügt und durchmischt. Je 1 µl Probenextrakt wurde nach der Zentrifugation vom Überstand entnommen und wie unter 3.2.2 beschrieben zur Messung eingesetzt.

3.2.1.2 Oregano

Die Entwicklung einer Extraktionsmethodik für Oregano wurde mittels einer Oreganopflanze (*Origanum vulgare* subsp. *vulgare*) durchgeführt. Die Blätter und Stängel wurden zuvor für eine Woche bei 30 °C in einem Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurden die Blätter von groben Stängeln befreit und mithilfe der Zentrifugalmühle vermahlen.

3.2.1.2.1 Waschen des Oregano mit verschiedenen Waschlösungen

In mehreren Ansätzen wurden 20 mg Oregano mit unterschiedlichen Lösungsmitteln und verschiedenen Kombinationen derer gewaschen. Dafür wurde je 1 ml der Lösungsmittel zu den Proben gegeben, diese durchmischt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Verwendet wurden TCA/Aceton (1/9, v/v), Ethanol, Aceton, Methanol. Nach der Trocknung der Pellets erfolgte die Extraktion mittels 500 µl Ameisensäure (70 %), Acetonitril und Reinstwasser. Nach Zentrifugation wurde 1 µl des Überstandes zur Messung eingesetzt (siehe 3.2.2). Die untersuchten Kombinationen sind der Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22: Verwendete Waschlösungskombinationen zur Abtrennung von Störsubstanzen von Oregano

Test	1. Waschschrift	2. Waschschrift	3. Waschschrift
1	<ul style="list-style-type: none"> Ethanol Aceton Trichloressigsäure/Aceton (1/9, v/v) Methanol 	X	X
2	Trichloressigsäure/Aceton (1/9, v/v)	<ul style="list-style-type: none"> Ethanol Aceton Methanol 	X
3	Trichloressigsäure/Aceton (1/9, v/v)	Methanol	<ul style="list-style-type: none"> Aceton Ethanol

In einer weiteren Untersuchung wurde eine Waschlösungskombination aus einer Studie zur Proteinextraktion für „widerspenstiges“ (engl.: *recalcitrant*) Pflanzengewebe nach Wang et al. (2006) verwendet. Es wurden 20 mg Oregano eingewogen und dreimal hintereinander mit folgenden Lösungen gewaschen: TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol (80 %) plus 0,1 Mol (M) Ammoniumacetat und Aceton (80 %). Nach jedem Waschschrift wurden die Proben

durchmischt, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Nach der Trocknung wurde das Pellet in je 500 µl Reinstwasser, Acetonitril und Ameisensäure (70 %) aufgenommen und zur Messung eingesetzt (vgl. 3.2.2). Zusätzlich wurde in einem weiteren Ansatz Oregano nach dem gleichen Schema (außer Zugabe von Ammoniumacetat) extrahiert und gemessen.

3.2.1.2.2 Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

Analog zu Paprika wurde auch für Oregano das ideale Volumenverhältnis der Extraktionsmittel ermittelt. Dafür wurden in mehreren Ansätzen 20 mg Oregano dreimal mit je 1 ml TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol (80 %) und Aceton (80 %) gewaschen und anschließend getrocknet. Danach wurden die Proben mit unterschiedlichen Verhältnissen von Ameisensäure (70 %), Acetonitril und Reinstwasser extrahiert (Verhältnisse siehe Tabelle 21). Das Gesamtvolumen betrug jedoch immer 1,5 ml. Die Proben wurden durchmischt, zentrifugiert und je 1 µl des Überstandes zur Messung eingesetzt (siehe 3.2.2).

3.2.1.2.3 Variation der Probeneinwaage

Von Oregano wurden 10, 15, 20 und 50 mg Probenmaterial eingewogen und jeweils dreimal mit den Lösungsmitteln TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol (80 %) und Aceton (80 %) gewaschen. Nach Trocknung des Pellets bei Raumtemperatur wurden je 500 µl Ameisensäure (70 %), Acetonitril und Reinstwasser zugegeben und gemischt. Nach Zentrifugation wurden die Probenextrakte wie unter 3.2.2 beschrieben mittels MALDI-TOF MS gemessen. Diese höheren Einwaagen wurden wegen der geringeren Dichte des Oregano im Gegensatz zu Paprika verwendet.

3.2.1.3 Pfeffer

Für die Entwicklung einer Extraktionsmethode für Pfeffer wurden ganze schwarze Pfefferkörner aus Sri Lanka verwendet, welche zuvor in einer Kugelmühle zu feinem Pulver vermahlen wurden.

3.2.1.3.1 Waschen des Pfeffers mit verschiedenen Waschlösungen

Für das Waschen wurden jeweils 20 mg gemahlener Pfeffer in 2 ml Reaktionsgefäßen eingewogen und mit je 1 ml verschiedener Lösungsmittel versetzt. Verwendet wurden TCA/Aceton (1/9, v/v), Dimethylsulfoxid (DMSO)/Aqua bidest (1/9, v/v), DMSO/Aceton (1/9, v/v), und Methanol. Nach dem Mischen und Zentrifugieren der Proben wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, danach mit je 500 µl Reinstwasser, Acetonitril und Ameisensäure (70 %) versetzt und durchmischt. Die Proben wurden zentrifugiert und 1 µl des Überstandes wurde zur Messung eingesetzt (siehe 3.2.2). Die untersuchten Waschlösungs-Kombinationen sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Verwendete Waschlösungskombinationen zur Abtrennung von Störsubstanzen von Pfeffer

Test	1. Waschschrift	2. Waschschrift	3. Waschschrift
1	<ul style="list-style-type: none"> DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v) DMSO/Aceton (1/9, v/v) TCA/Aceton (1/9, v/v) 	X	X
2	DMSO/Aceton (1/9, v/v)	<ul style="list-style-type: none"> DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v) TCA/Aceton (1/9, v/v) 	X
3	DMSO/Aceton (1/9, v/v)	DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v)	<ul style="list-style-type: none"> TCA/Aceton (1/9, v/v) Methanol

3.2.1.3.2 Mechanische Methoden zum Zellaufschluss

In den folgenden Versuchen wurden zusätzlich zu der Extraktion mittels Ameisensäure (70 %), Acetonitril und Reinstwasser drei mechanische Aufschlussverfahren getestet.

a) Ultra-Turrax (Dispergier-Gerät):

200 mg Pfeffer wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit 10 ml DMSO/Aceton (1/9, v/v) versetzt. Mittels Ultra-Turrax wurde das Pfeffer-Lösungsmittel-Gemisch für 2 Minuten zerkleinert und homogenisiert. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v) wurden 10 ml Reinstwasser zu dem Pellet gegeben. Ein Aliquot (500 µl) des Proben-Wasser-Gemisches wurde entnommen und mit gleichen Anteilen Ameisensäure (70 %) und Acetonitril vermischt. Nach dem Zentrifugieren wurde 1 µl des Überstandes zur Messung eingesetzt (s. 3.2.2).

b) Tissue Lyser:

In vier Ansätzen wurden 20 mg und 50 mg Pfeffer in 2 ml Reaktionsgefäßen eingewogen, mit je 1 ml DMSO/Aceton (1/9, v/v) versetzt und Glasbeads zugegeben (s. Tabelle 24). Die Proben wurden 30 Sekunden mittels Tissue Lyser homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift mit DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v) wurde das Pellet inkl. der Glasbeads bei Raumtemperatur getrocknet und folgend mit je 500 µl Reinstwasser, Ameisensäure (70 %) und Acetonitril versetzt. Nach dem Zentrifugieren wurde je 1 µl des Überstandes zur Messung eingesetzt (s. 3.2.2).

Tabelle 24: Verschiedenen Kombinationen von Glasbeads und Probenvolumina

Einwaage von Pfeffer	Glasbeads (Anzahl)
20 mg	10
20 mg	20
50 mg	10
50 mg	20

c) Ultraschallbad:

In drei Ansätzen wurden je 20 mg Pfeffer in einem 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Nach zwei Waschschritten mittels DMSO/Aceton und DMSO/Reinstwasser (je 1/9, v/v) und anschließender Trocknung der Pellets erfolgte die Extraktion mittels 500 µl Ameisensäure (70 %), Acetonitril und Reinstwasser. Zusätzlich wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aufarbeitung die Probenlösungen für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben (s. Tabelle 25). Im Anschluss an die Extraktion erfolgte die Zentrifugation und die Entnahme von jeweils 1 µl des Überstandes zur Messung mittels MALDI-TOF MS (s. 3.2.2).

Tabelle 25: Zeitpunkte der Ultraschallbehandlung

Versuch	Behandlung mittels Ultraschallbad (10 min.)
1	Nach Zugabe von 1 ml DMSO / Aceton (1/9, v/v)
2	Nach Zugabe von 1 ml DMSO / Reinstwasser (1/9, v/v)
3	Nach Zugabe der Extraktionsmittel

3.2.1.3.3 Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

Um für Pfeffer das ideale Verhältnis der Extraktionsmittelvolumina zu ermitteln wurden in mehreren Ansätzen 20 mg gemahlener Pfeffer zweimal mit je 1 ml DMSO/Aceton und DMSO/Reinstwasser (je 1/9, v/v) gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet mit verschiedenen Verhältnissen Reinstwasser, Acetonitril und Ameisensäure (70 %) versetzt (Verhältnisse siehe Tabelle 21), das Gesamtvolumen betrug jedoch immer 1,5 ml. Die Proben wurden gut durchmischt, zentrifugiert und je 1 µl des Überstandes zur Messung eingesetzt (s. 3.2.2).

3.2.1.3.4 Variation der Probeneinwaage

In vier Ansätzen wurden 10, 20, 50 und 100 mg Pfeffer eingewogen, zweimal mit je 1 ml DMSO/Aceton und DMSO/Reinstwasser (je 1/9, v/v) gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Es folgte eine Zugabe von je 500 µl Reinstwasser, Acetonitril und Ameisensäure (70 %). Nach dem Mischen und Zentrifugieren wurden je 1 µl des Überstandes zur Messung eingesetzt (s. 3.2.2).

3.2.2 MALDI-TOF MS Messung

Alle Messungen wurden an einem Autoflex Speed II (Bruker Daltoniks, Bremen) durchgeführt. Von jedem Probenextrakt wurde nach Zentrifugation 1 µl des Überstandes auf einen Edelstahlprobenträger (MTP 384 polished Steel BC Target) pipettiert und so lange bei Raumtemperatur getrocknet, bis die Lösungsmittel komplett verdampft waren. Die Spots wurden mit je 1 µl α -HCCA-Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) überschichtet und nochmals getrocknet. Die Spektrengenerierung erfolgt mittels der Software flexControl im positiv linearen Modus. Da sich die drei ausgewählten Gewürze hinsichtlich ihrer Zusammensetzung unterscheiden, wurden die Grundeinstellungen für Paprika, Pfeffer und Oregano jeweils wie folgt angepasst:

Matrixlösung (gesättigte HCCA-Lösung)	<ul style="list-style-type: none">• 14 mg α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (HCCA) 500 µl Acetonitril, 475 µl Reinstwasser, 25 µl Trifluoressigsäure (TFA) (Bruker 2017)
Software:	<ul style="list-style-type: none">• Software - flexControl 3.4, Bruker Daltoniks, Bremen
Modus	<ul style="list-style-type: none">• linear, positiv
Lasereinstellung	<ul style="list-style-type: none">• Stickstoff-UV-Laser, $\lambda = 337$ nm• Laserenergie: 28-90 % (Paprika) Laserenergie: 28-90 % (Pfeffer) Laserenergie: 30-90 % (Oregano) bei Global Attenuator Offset von 22 % Frequenz 1000.0 Hz• Sample Rate and Digitizer Settings: Resolution 2.00 <i>gigasamples per second</i> (GS/s)• Random Walk: Laserschüsse einer Rasterstelle: 20 bei Grenzdurchmesser bis 2000 µm

Massenbereich	<ul style="list-style-type: none">• m/z 2-16 kDa
Spektrengenerierung	<ul style="list-style-type: none">• Realtime Smoothing: medium• Akkumulierung von 10 Einzelspektren zu einem Summenspektrum (Frequenz: 1000 Hz, 200er Schritte)
Hochspannung	<ul style="list-style-type: none">• Ionenquelle 1: 19.50 kV• Ionenquelle 2: 18.20 kV (Paprika) 18.00 kV (Pfeffer) 17.90 kV (Oregano)• Linse: 7.00 kV (Paprika) 6.75 kV (Pfeffer) 7.20 kV (Oregano)• Pulsed Ion Extraction: 340 ns (Paprika) 150 ns (Pfeffer) 280 ns (Oregano)
Matrixunterdrückung:	<ul style="list-style-type: none">• Modus: Deflection, Unterdrückung bis 1900 Da

Mittels des Kalibrationsstandards der Firma Bruker Daltonik (BTS/*bacterial test standard*, sieben Kalibrierpunkte im Massenbereich von 3637,8 Da-13683,2 Da) wurde vor jeder Erstellung eines Referenzspektrums und routinemäßig einmal pro Woche eine interne Kalibrierung durchgeführt, um vergleichbare Massenspektren generieren zu können.

Alle Messungen erfolgten zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit standardisiert mittels einer automatischen Messmethode, welche für die jeweilige Matrix optimiert wurde. Es wurden nur Massenspektren, welche folgende Qualitätskriterien erfüllten, registriert und gespeichert:

- Minimale Peak-Auflösung: > 400
- Minimales S/N-Verhältnis: 3
- Minimale Intensität: 600

3.2.3 Erstellung von Referenzspektren und Identifikation mittels MALDI-Biotyper

Für die Erstellung eines Referenzspektrums (MSP = *Main spectra profile*) wurden die Gewürzproben im Dreifachansatz nach der jeweils entwickelten Methode extrahiert.

Von jedem der drei biologischen Replikate wurde zehnmal jeweils 1 µl auf ein Proben target aufgetragen, um insgesamt 30 Massenspektren zu generieren. Zusätzlich wurde für die Kalibrierung 1 µl des Bakterienstandards (BTS) auf das Target aufgetragen. Jeder Spot wurde mit 1 µl α-HCCA-Matrix überschichtet und nach erfolgreicher Kalibrierung mit den unter Kapitel 3.2.2 beschriebenen Parametern mittels MALDI-TOF gemessen. Die 30 erstellten Massenspektren wurden mit Hilfe der Software FlexAnalysis auf ihre Qualität überprüft. Jedes Einzelspektrum wurde mit den anderen verglichen und auf Abweichungen kontrolliert und abweichende Spektren aus der Auswahl gelöscht. Aus den verbliebenen Spektren (mindestens 20 derselben Qualität) wurden im Anschluss mit Hilfe der Software Biotyper Compass Explorer Referenzspektren erstellt und in der internen Datenbank gespeichert. Zur Qualitätskontrolle wurden die Massenspektren, aus denen das MSP generiert wurde, mit dem erstellten MSP abgeglichen. Mit einem durchschnittlichen Score Value über 2,5 und einer relativen Standardabweichung unter 10 % wurde das Referenzspektrum als gut und die Methode als robust bewertet.

Für die Identifikation wurden generierte Massenspektren mit Hilfe der Software Biotyper Compass Explorer 4.1 mit in der Datenbank gespeicherten Referenzspektren abgeglichen. Der erhaltene numerische Wert (Score Value oder log(score)-Wert) ist ein Maß für die Übereinstimmung der Massenspektren mit den Referenzspektren. Der Höchstwert liegt bei 3 (größte Übereinstimmung).

3.2.4 Bestimmung von Einflussfaktoren auf die MALDI-TOF-MS Spektren

3.2.4.1 Einfluss der Trocknung am Beispiel von Paprika

Überprüft wurde, ob und wie sich zwei verschiedene Trocknungsverfahren und zusätzlich die Trocknungsdauer auf die Massenspektren von Paprikapulver auswirkten. Frische Spitzpaprika derselben Charge wurden mit zwei verschiedenen und im Folgenden beschriebenen Verfahren im Dreifachansatz getrocknet, mittels Zentrifugalmühle gemahlen und nach der für Paprika optimierten Methodik extrahiert (vgl. 4.1). Die Messung mittels MALDI-TOF MS erfolgte, wie unter 3.2.2 beschrieben.

Zusätzlich wurden ganze, getrocknete Gewürzpaprika (bereits getrocknet bezogen von der Firma RAPS GmbH) von den Samen befreit und nach dem gleichen Schema wie oben gemahlen, extrahiert und gemessen. Sie wurden als Referenzspektren (MSPs) in der internen Datenbank gespeichert (vgl. 3.2.3).

Gefriertrocknung

Drei Spitzpaprika wurden von den Samen befreit und in Stücke von ca. 1 cm Durchmesser geschnitten. Diese wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren, anschließend über fünf Tage gefriergetrocknet und zur Messung eingesetzt.

Lufttrocknung im Trockenschrank

Zwölf Spitzpaprika wurden in einem Trockenschrank bei konstanten 30 °C über insgesamt neun Wochen getrocknet (s. Abbildung 9). Nach drei, fünf, sieben und neun Wochen wurden jeweils drei Spitzpaprika entnommen, von den Samen befreit und zur Messung eingesetzt.



Abbildung 9: Spitzpaprika zu Beginn des Trocknungsversuches im Trockenschrank

Alle generierten Massenspektren der Spitzpaprika wurden mittels der Software Biotyper Compass Explorer (4.1) gegen die erstellten Referenzspektren der bereits getrockneten Gewürzpaprikaprobe abgeglichen. Die erhaltenen Score Values wurden gemittelt und mit ihrer Standardabweichung in einem Diagramm visualisiert.

3.2.4.2 Einfluss einzelner Pflanzenbestandteile

Bei der Produktion von Paprikapulver werden je nach Sorte und gewünschtem Schärfegrad zusätzlich zum Fruchtfleisch und den Scheidewänden auch mehr oder weniger bis keine Samen mitgemahlen (Schormüller 2013). Es wurde untersucht, ob sich die Massenspektren der einzelnen Bestandteile der Paprikafrucht unterschiedlich darstellen. Dafür wurde frische Spitzpaprika aus dem Handel erworben, in ihre Bestandteile zerlegt (siehe Abbildung 10) und über 5 Tage gefriergetrocknet.

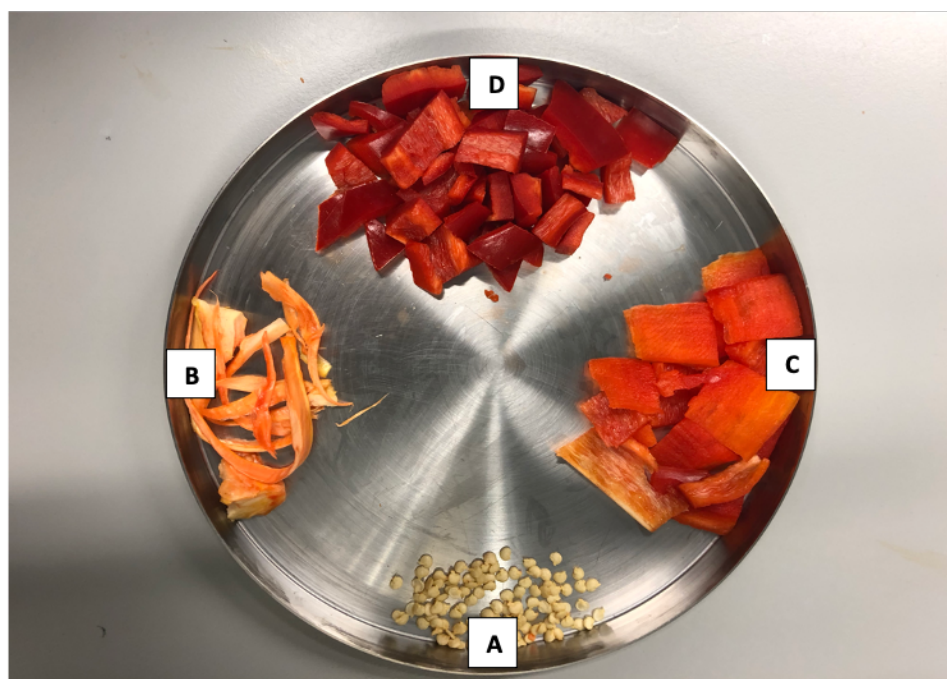


Abbildung 10: Auftrennung von Spitzpaprika in ihre Bestandteile: Samen (A), Scheidewände (B), Fruchtfleisch ohne Exokarp (C) und Fruchtfleisch mit Exokarp (D)

Die getrockneten vier Pflanzenteile wurden separat mittels Zentrifugalmühle gemahlen, nach der für Paprika entwickelten Extraktionsmethodik (vgl. 4.1) aufbereitet und wie unter 3.2.2 beschrieben mittels MALDI-TOF-MS gemessen. Jeweils neun Massenspektren pro Probe wurden mittels der Software ClinPro Tools (Bruker Daltonik) in einer Pseudo-Gelansicht dargestellt und auf Unterschiede in den Massen untersucht. Zur Erstellung spezifischer Referenzspektren wurden verschiedene Mischungen von Fruchtfleisch und Samen hergestellt (Samenanteil: 0, 5, 15, 25 und 50 %) und gemessen. Die erhaltenen Massenspektren wurden als Referenzspektren in die interne Datenbank eingelesen (vgl. 3.2.3).

3.2.4.3 Einfluss von mikrobieller Kontamination

Um einen möglichen Einfluss mikrobieller Kontaminationen bzw. mikrobiell verursachten Verderbs auf die Massenspektren festzustellen, wurde frische Spitzpaprika mit zwei Verderbserregern inokuliert. Dafür wurde das Bakterium *Pectobacterium (P.) carotovorum* und der Schimmelpilz *Aspergillus (A.) niger* ausgewählt.

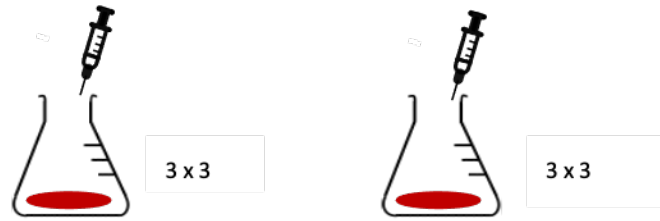
Beide Keime wurden zunächst auf Malz Extrakt Agar plus Novobiocin (MEA+) (*A. niger*) bzw. auf Plate Count Agar (PC) (*P. carotovorum*.) ausgestrichen und für 72 h bei 25 °C inkubiert. Nach der Anzucht wurden von beiden Keimen Suspensionen hergestellt und auf eine Keimzahl von jeweils 1×10^6 KbE/ml verdünnt.

Wie in Abbildung 11 schematisch dargestellt, wurden in mehreren Ansätzen je 10 g Spitzpaprika nach äußerlicher Desinfektion mittels 100%igem Ethanol in 100 ml Erlenmeyerkolben eingewogen. Auf 18 Proben wurden je 0,1 ml einer Kochsalzlösung (0,9 %) aufgetragen (Negativ-Kontrolle). Von den restlichen 36 Proben wurde die eine Hälfte mit je 0,1 ml der Bakteriensuspension bedeckt („Versuchsproben Bakterium“) und die andere Hälfte mit 0,1 ml der Schimmelpilzsuspension („Versuchsproben Schimmelpilz“). Nach jedem Auftragen wurde darauf geachtet, dass die 100 µl der jeweiligen Suspension die Paprikastücke möglichst vollständig bedecken und einziehen können. Alle Proben wurden in einem Brutschrank bei 25 °C gelagert.

Zum Zeitpunkt 0 (ca. 30 Minuten nach dem Auftragen der Suspensionen), nach einer Woche und nach zwei Wochen wurden jeweils drei Negativ-Kontrollen und je drei der beiden Versuchsproben mikrobiologisch untersucht. Parallel wurde die identische Zahl an Proben zu den jeweiligen Zeitpunkten gefriergetrocknet und im Anschluss nach der für Paprika entwickelten Extraktionsmethodik extrahiert und mittels MALDI-TOF MS gemessen (vgl. 4.1 bzw. 3.2.2).

Negativ Kontrolle:

Zugabe von 0,1 ml NaCl-Lösung
(0,9 %) zu je 10 g Paprika

**Versuchsprobe (Bakterium)**

Zugabe von 0,1 ml
Bakteriensuspension (10^6 KbE/ml)
zu je 10 g Paprika

**Versuchsprobe (Schimmelpilz)**

Zugabe von 0,1 ml
Schimmelpilzsuspension
(10^6 KbE/ml) zu je 10 g Paprika



Gefriertrocknung, Extraktion und
MALDI-TOF-MS-Messung nach
0, 1 und 2 Wochen

Mikrobiologische Untersuchung
nach 0, 1 und 2 Wochen

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung eines mikrobiellen Einflusses auf die Massenspektren von Paprika

Mikrobiologische Untersuchung:

Jede Probe wurde zunächst mit 90 ml Verdünnungsflüssigkeit versetzt und für 60 Sekunden mit Hilfe eines Stomachers homogenisiert. Je nach Stärke der Keimbesiedelung wurden Verdünnungsreihen bis zu 10^{-14} erstellt. Von jeder Reihe wurden 100 μ l entnommen, auf MEA+-Agar bzw. PC-Agar ausgespatelt und bei 25°C für 3 Tage bebrütet. Die Keimzahl wurde anschließend mittels folgender Formel nach Farmiloe et al. (1954) bestimmt:

$$\bar{C} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d = \text{KbE/g}$$

\bar{C} = Anzahl der koloniebildenden Einheiten

$\sum c$ = Summe der ausgezählten Kolonien

n_1 = Zahl der Platten mit der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 = Zahl der Platten mit der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe

d = Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Bei der ersten mikrobiologischen Untersuchung zum Zeitpunkt 0 wurden die Bakterien- bzw. Pilzkolonien morphologisch bestimmt und zur Qualitätssicherung eine Identifikation mittels MALDI-TOF-MS durchgeführt. In den beiden folgenden Versuchsdurchgängen konnten alle Kolonien den jeweils identifizierten Kolonien morphologisch zugeordnet werden.

3.2.4.4 Einfluss durch Sortenunterschiede

a) Paprika

Für die Ermittlung des möglichen Einflusses von Sorten wurden fünf unterschiedliche Paprikasorten aus dem Handel untersucht (vgl. 3.1.1): Peperoni, zwei Chilisorten, Jalapeño und Habanero. Sie gehörten alle bis auf eine zur Art *Capsicum annuum* L. Die Habanero dagegen war eine Sorte der Pflanzenart *Capsicum chinense* L.

Von jeder Paprikafrucht wurde das Fruchtfleisch von den Samen getrennt und für eine Woche gefriergetrocknet. Die getrockneten Proben wurden gemahlen, nach der für Paprika entwickelten Methodik extrahiert (vgl. 4.1.1) und wie unter 3.2.2 beschreiben mittels MALDI-TOF MS gemessen.



Abbildung 12: Verschiedene *Capsicum*-Früchte: Peperoni (A), Habanero (B), Jalapeño (C) und zwei Chilisorten (D)

b) Oregano:

Vier verschiedene Oregano-Pflanzen (vgl. 3.1.1) aus dem Handel wurden analysiert: *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* („Oregano“), *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* („Griechischer Oregano“), *Origanum onites* L. (Türkischer Oregano) und *Lippia origanoides* K. („Mexikanischer Oregano“). Sie unterschieden sich u.a. in Gattung, Art und Unterart, jedoch wird aus allen das Gewürz mit der Bezeichnung „Oregano“ hergestellt.

Die Pflanzen wurden gebündelt und im Trockenschrank bei 30 °C für 1 Woche getrocknet (Abbildung 13). Anschließend wurden die Blätter von den größeren Stängeln befreit, gemahlen, nach der für Oregano entwickelten Methodik extrahiert und mittels MALDI-TOF MS gemessen (vgl. 4.2 und 3.2.2).



Abbildung 13: Trocknung verschiedener Oregano-Pflanzen im Trockenschrank

Die generierten Massenspektren der verschiedenen Sorten von Paprika (hier zusätzlich noch die Massenspektren von Spitzpaprika aus der Methodenoptimierung) und Oregano wurden mit Hilfe der Software ClinProTools (Bruker Daltonics) in Form einer Pseudo-Gelansicht dargestellt (jeweils neun Spektren pro Probe) und so visuell nach Unterschieden in den Spektren beurteilt. Zusätzlich wurden mit der Software Biotyper Compass Explorer Dendrogramme erstellt, in denen bestehende Unterschieds- bzw. Ähnlichkeitsbeziehungen mittels hierarchischer Clusterung dargestellt werden konnten.

3.2.5 Herstellung und Messung künstlich verfälschter Testmuster

In einer Versuchsreihe wurde überprüft, ob und ab welchem Grad und wie sensitiv ausgewählte Verfälschungen mittels der optimierten Extraktions- und Messmethodik nachgewiesen werden können. Zunächst wurden für Paprika, Oregano und Pfeffer je ein in der Literatur beschriebenes häufig eingesetztes Verfälschungsmittel ausgewählt (s. Tabelle 26).

Tabelle 26: Ausgewählte Verfälschungen für Paprika, Oregano und Pfeffer

Gewürz	Verfälschungsmittel	Literaturnachweis
Paprika	Tomatenschalen	De (2003)
Oregano	Olivenblätter	Black et al. (2016)
Pfeffer	Papaya-Samen	Curl et al. (1983)

Getestet wurden getrocknete Olivenblätter, Tomaten und eine Papayafrucht aus dem regulären Handelsangebot (vgl. 3.1.1). Die Haut der Tomaten und die Kerne der Papaya wurden händisch gewonnen und für eine Woche im Trockenschrank getrocknet. Alle Verfälschungsmittel wurden gemahlen und in Konzentrationen von 5, 10, 15, 25 und 50 % (*weight per weight* (w/w)) mit dem jeweiligen authentischen Gewürz gemischt. Die Probeneinwaage betrug immer 20 mg. Bei der Herstellung der Paprika-Verfälschungen mit Tomatenschalen wurde nur das reine gemahlene Paprikafruchtfleisch ohne Samenbeimengungen verwendet.

Alle erstellten Verfälschungsmuster wurden, nach der für das jeweilige Gewürz entwickelten Extraktionsmethodik, aufbereitet (vgl. 4.1-4.3) und wie unter 3.2.2 beschrieben mittels MALDI-TOF MS gemessen. Von allen Proben wurden zusätzlich Referenzspektren (MSPs) erstellt und in die interne Datenbank eingelesen (vgl. 3.2.3). Die Unterschiede in der Zuordnung der Verfälschungsmuster zu den jeweiligen MSP wurden mittels Mann-Whitney Rangsummentest unter Anwendung von SigmaPlot 14.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) auf Signifikanz geprüft.

3.2.6 Messung von Realproben

Von Paprika, Oregano und Pfeffer wurden die in Kapitel 3.1.1 aufgelisteten Handelsproben untersucht. Sie wurden im Dreifachansatz und nach der für das jeweilige Gewürz entwickelten Extraktionsmethodik aufbereitet (vgl. 4.1-4.3). Die resultierenden Probenextrakte wurden, wie unter 3.2.2 beschrieben, mittels MALDI-TOF MS gemessen.

Die so generierten Massenspektren (je drei biologische und drei technische Replikate pro Probe) wurden mittels der Software Biotyper Compass Explorer (4.1) gegen die bereits erstellten Referenzspektren abgeglichen (vgl. 3.2.3). Die Score Values wurden gemittelt und bei Werten über 1,7 wurde das zugehörige Referenzspektrum erfasst.

4 Ergebnisse

4.1 Paprika

4.1.1 Entwicklung und Optimierung der Extraktionsmethode

Die Methodenentwicklung erfolgte ausgehend von der Extraktionsmethode A (vgl. 3.2.1), welche dann Schritt für Schritt optimiert wurde. Nach jedem neuen Ergebnis wurde die Anzahl der Massen in Verbindung mit ihrer relativen Standardabweichung (RSD) überprüft. Angestrebt wurde hierfür eine möglichst hohe Massenzahl mit einer RSD unter 10 %. Als weiteres Qualitätskriterium wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) der intensivsten 5 Peaks bewertet. Dieser Wert sollte ebenfalls möglichst hoch sein (vgl. 3.2.1).

Für die Matrix Paprika konnten mit der Methode A (vgl. 3.2.1) erste spezifische Massenpeaks im Bereich von 2 bis 16 kDa generiert werden (Abbildung 14). Die durchschnittliche Massenzahl betrug 34 mit einer RSD von 57 %. Die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der intensivsten fünf Massenpeaks lagen im Bereich von 15-75.

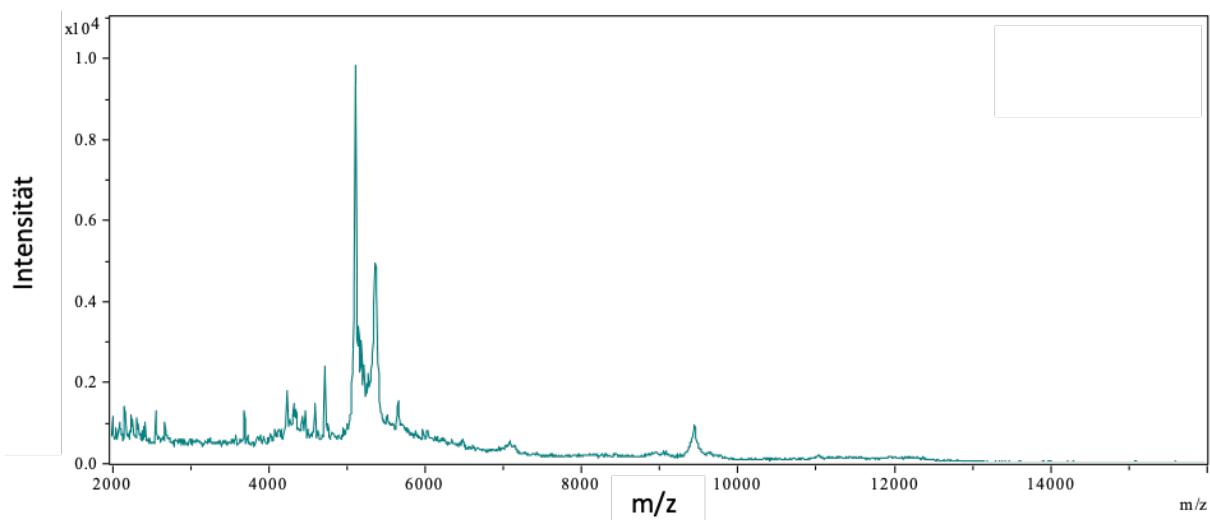


Abbildung 14: MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Spitzpaprika nach Extraktion mit der Methode A (vgl. 3.2.1)

4.1.1.1 Waschen der Paprika mit verschiedenen Waschlösungen

Im Vergleich zur Methode A lieferte das Waschen von Paprika mit verschiedenen Waschlösungen, zur Abtrennung von Störsubstanzen vor der Extraktion, höhere Massenausbeuten mit gleichzeitig geringeren RSDs. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Die S/N-Verhältnisse fielen insgesamt in etwa gleich bis geringgradig höher aus. Die größte Massenausbeute (110) mit gleichzeitig der höchsten Reproduzierbarkeit (RSD 5,9 %) konnte nach dreimaligem Waschen mit TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton erreicht werden. Alle zugehörigen Massenspektren sind im Anhang hinterlegt (siehe Abbildung 59-61).

Tabelle 27: Auswertung der Massenspektren von Paprika nach ein- bis dreimaligem Waschen mit verschiedenen Waschlösungen (grün hinterlegt: bestes Ergebnis)

Einmaliges Waschen:

Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
Ethanol	38	50	18 –78
Aceton	47	28	21-86
TCA/Aceton (1/9, v/v)	58	8,1	24-76
Methanol	53	21	28-112

Zweimaliges Waschen:

1. Waschlösung	2. Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Aceton	78	8,5	13-110
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Methanol	112	6,7	34-84
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Ethanol	95	7,2	18-108

Dreimaliges Waschen:

1. Waschlösung	2. Waschlösung	3. Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Methanol	Aceton	110	5,9	30-95
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Methanol	Ethanol	111	7,9	35-73

4.1.1.2 Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

Die Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel Reinstwasser, Acetonitril und Ameisensäure (70 %) und Ergebnisse dieser Testreihe sind in Tabelle 28 dargestellt. Mit einem Verhältnis der Extraktionsmittel von 1:1:1 (Tab. 28 A) konnte eine durchschnittliche Massenanzahl von 109,4 mit einer RSD von 5,2 % generiert werden. Die S/N-Verhältnisse lagen bei 27 bis 90. Mehr Massen (110 bis 127) konnten in den Tests C, E, F, G und J generiert werden, jedoch lag die RSD jedes Mal über 10 %. In den Tests I und M (ohne Ameisensäure) konnten keine auswertbaren Massenspektren generiert werden. Höhere S/N-Verhältnisse als bei Test A konnten nicht erreicht werden.

Tabelle 28: Auswertung der Massenspektren von Paprika nach Variation der Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel (grün hinterlegt: bestes Ergebnis)

Test	Reinst- wasser [μl]	Acetonitril [μl]	Ameisensäure (70 %) [μl]	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
A	500	500	500	109	5,2	27-90
B	-	1000	500	108	4,6	25-71
C	250	750	500	115	14	23-71
D	750	250	500	95	8,6	28-43
E	1000	-	500	120	17	27-57
F	-	500	1000	127	16	24-71
G	250	500	750	111	11	27-67
H	750	500	250	108	6,7	27-66
I	1000	500	-	-	-	-
J	500	-	1000	115	16	24-54
K	500	250	750	101	7,9	24-54
L	500	750	250	109	4,3	25-71
M	500	1000	-	-	-	-

4.1.1.3 Variation der Probeneinwaage

Durch eine Erhöhung oder Verringerung der Probeneinwaage im Vergleich zu den bisher verwendeten 20 mg konnte keine Verbesserung der Qualitätskriterien erreicht werden (s. Tabelle 29). Man erhielt weniger Massen in Verbindung mit höheren RSDs.

Tabelle 29: Auswertung der Massenspektren von Paprika nach Variation der Probenmenge
(grün hinterlegt: bestes Ergebnis)

Probeneinwaage [mg]	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
10	101	10	31-68
20	109	5,4	31-91
50	109	14	28-79
100	87	25	21-56

4.1.1.4 Optimierung der Extraktionsmethode

Die besten Ergebnisse hinsichtlich Massenzahl, relativer Standardabweichung und Signal-zu-Rausch-Verhältnissen konnten mit einer Probeneinwaage von 20 mg, dreimaligem Waschen (TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton) und einem Volumenverhältnis der Extraktionsmittel von 1:1:1 erreicht werden. Das Fließschema für dieses optimierte Verfahren und die MALDI-TOF MS Spektren von frischer Spitzpaprika inkl. Samen sind in den Abbildungen 15 bzw. 16 dargestellt. Es konnten im Schnitt 109 Massen mit einer RSD von 5,4 % und S/N-Verhältnissen bis zu 95 erreicht werden.

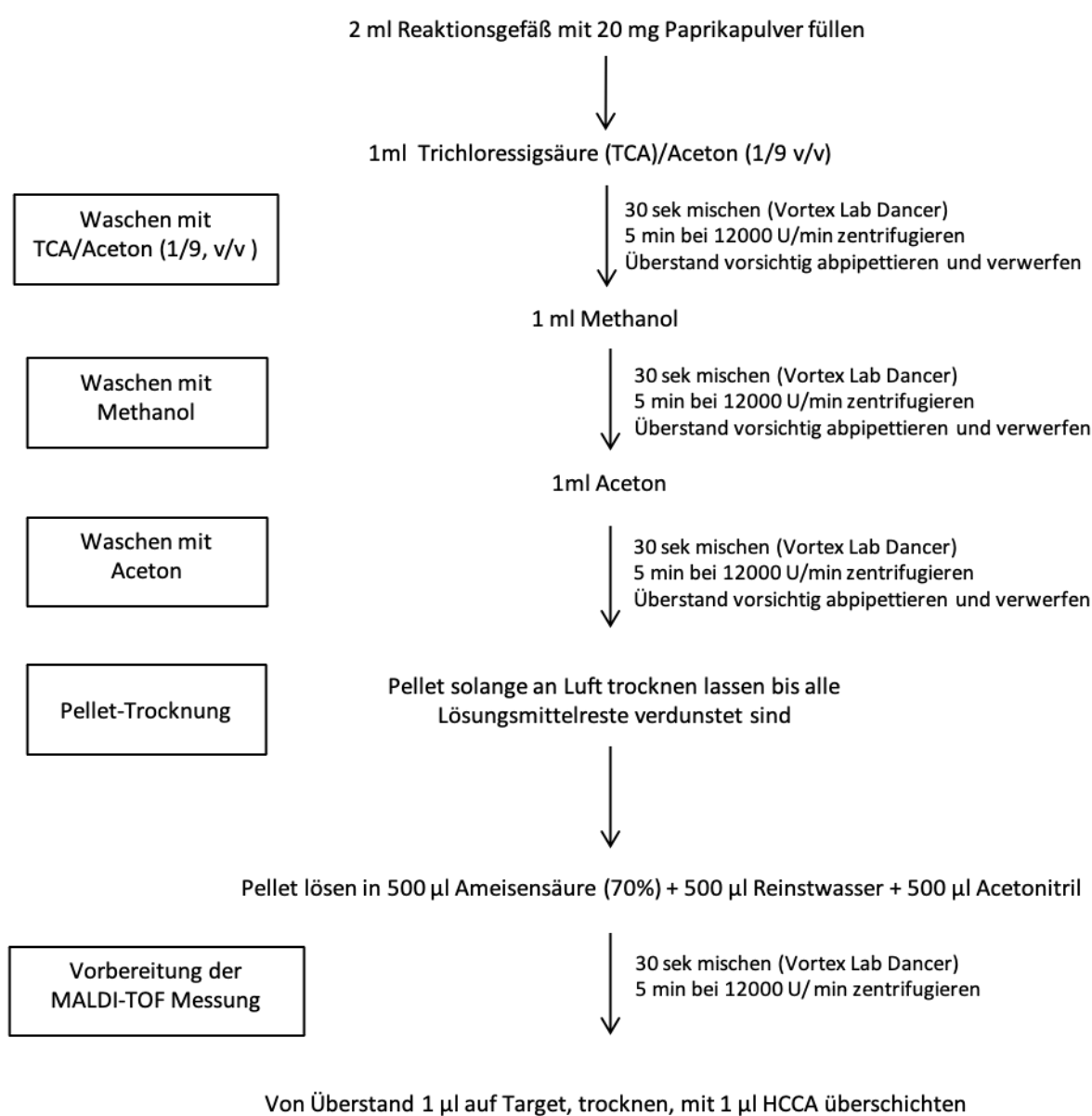


Abbildung 15: Optimiertes Extraktionsschema zur MALDI-TOF-MS Messung von Paprika

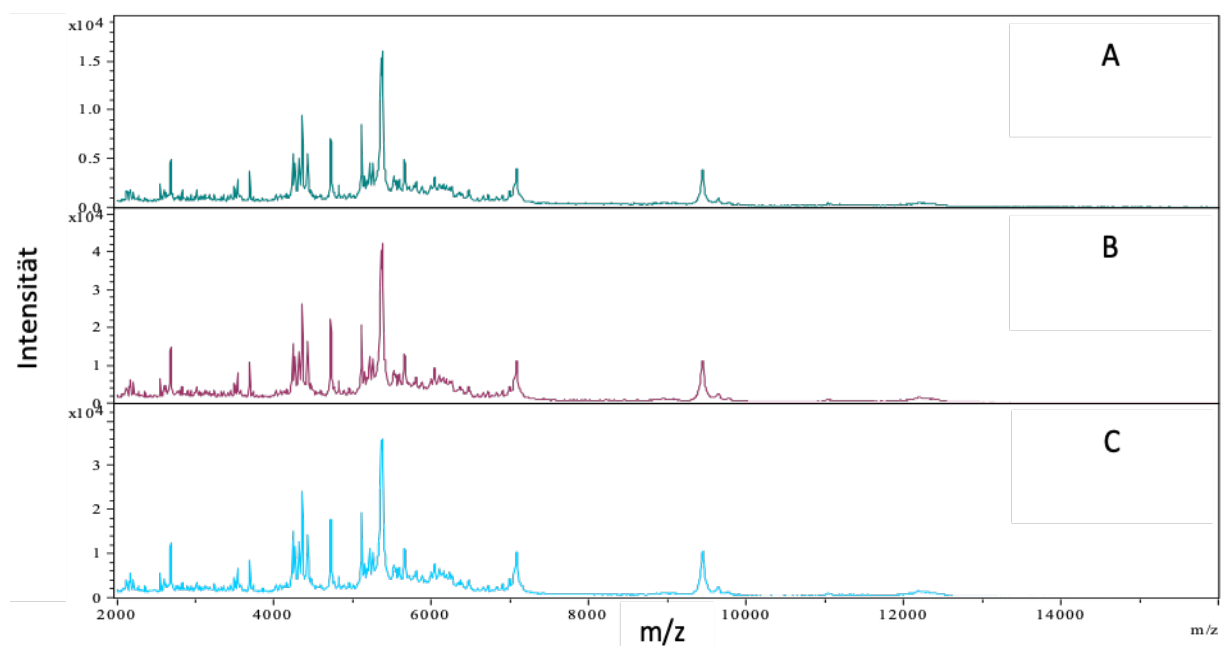


Abbildung 16: MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von Spitzpaprika (inkl. Samen) extrahiert mittels optimierter Methode (A–C biologische Replikate von drei unterschiedlichen Tagen)

4.1.2 Einflussfaktoren auf das MALDI-TOF MS Spektrum

4.1.2.1 Einfluss der Trocknung auf das Spektrum

Zwei verschiedene Trocknungsarten und zusätzlich die Trocknungsdauer wurden am Beispiel von Spitzpaprika verglichen (vgl. 3.2.4.1). Wie in Abbildung 17 ersichtlich, zeigten die Massenspektren der im Trockenschrank getrockneten Paprika im Vergleich zu der gefriergetrockneten Paprika zusätzliche Massen im Bereich von 5000-6000 Da. Mit steigender Trocknungsdauer war außerdem ein zunehmendes Rauschen im selben Massenbereich zu erkennen.

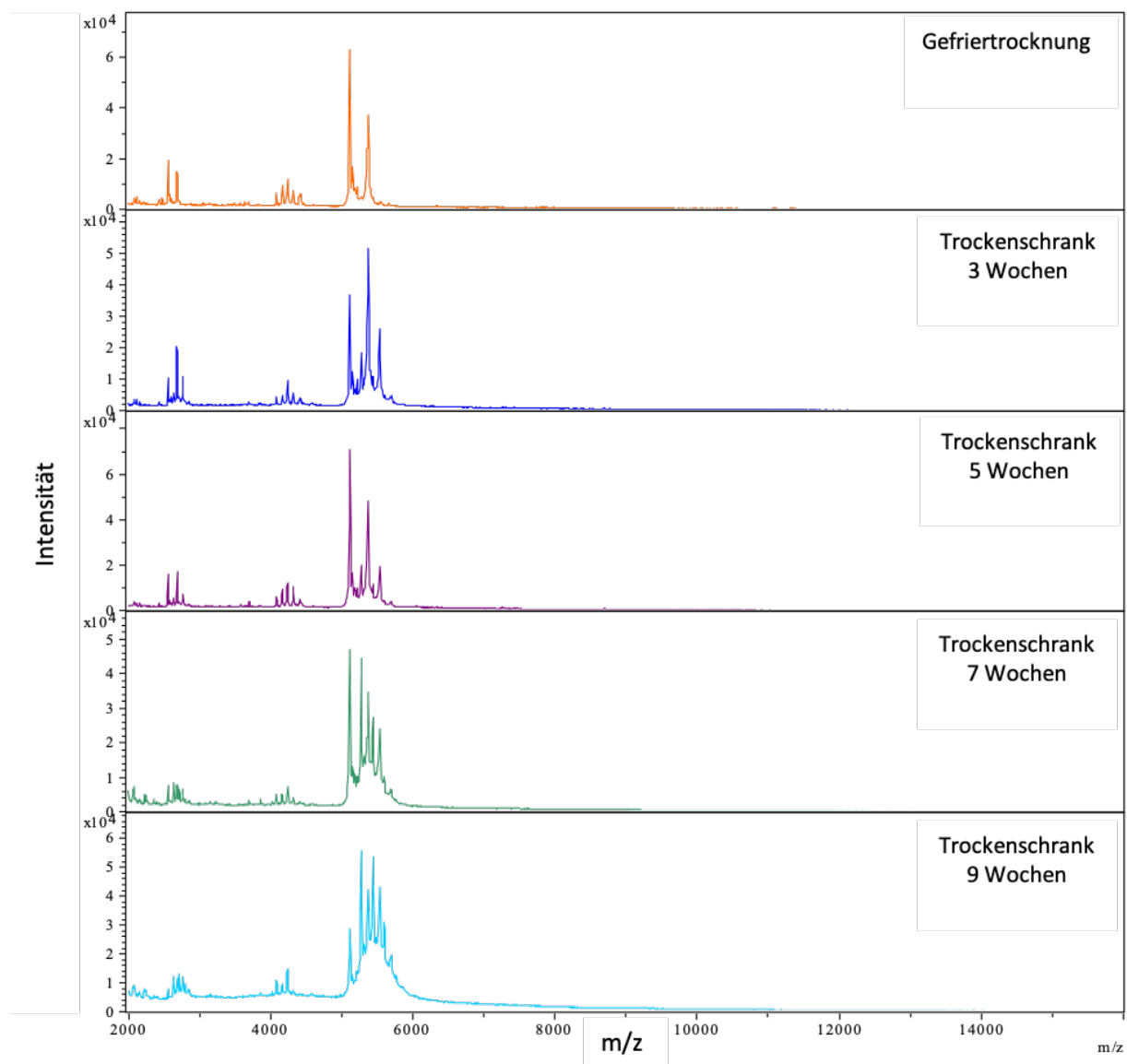


Abbildung 17: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von unterschiedlich getrockneter Spitzpaprika (excl. Samen)

Eine Gewürzpaprikaprobe (bereits getrocknet erworben und von den Samen befreit) wurde ebenfalls mittels der optimierten Methodik extrahiert und gemessen. Die Massenspektren wurden als Referenzspektren gespeichert (vgl. 3.2.3) und für die Anwendung mittels Biotyper Compass Explorer (4.1) hinterlegt. In folgender Abbildung 18 sind drei biologische Replikate dieser Massenspektren abgebildet. Sie zeigten ebenfalls, wie die Massenspektren der Spitzpaprika nach neun Wochen Trocknung, ein erhöhtes Rauschen im Massenbereich von 5000-6000 Da.

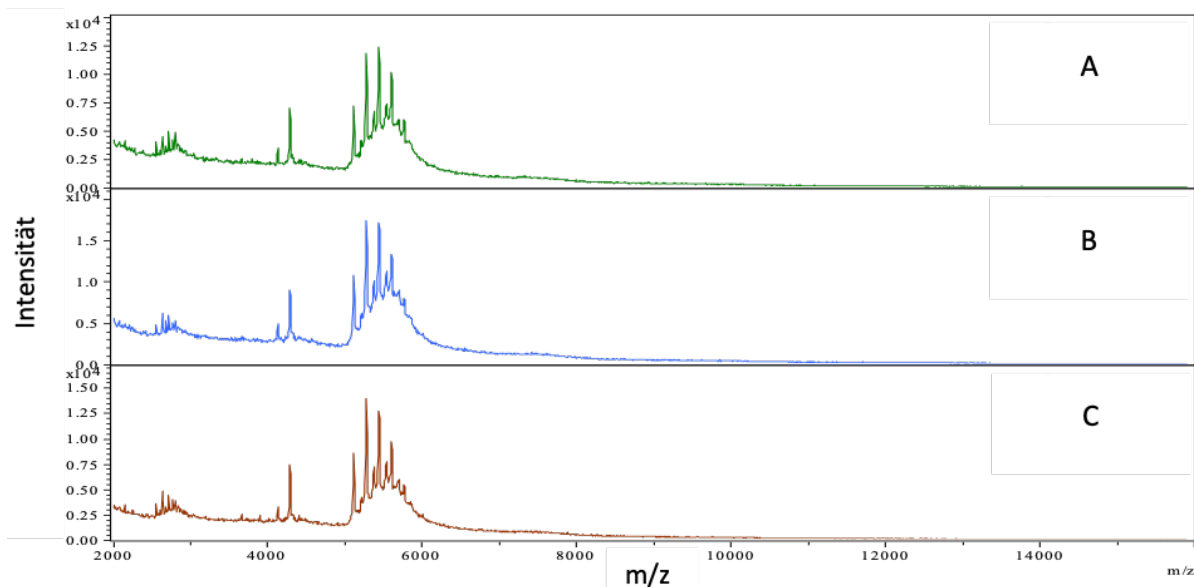


Abbildung 18: MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von getrockneter Gewürzpaprika excl. Samen (A-C biologische Replikate)

Der Abgleich der Massenspektren der Spitzpaprika mit den erstellten Referenzspektren von getrockneter Gewürzpaprika mittels der Software Biotyper Compass Explorer (4.1) lieferte die in Abbildung 19 dargestellten Score Values. Bei der Identifizierung von Mikroorganismen handelt es sich laut den Herstellerempfehlungen bei Werten zwischen 2 und 3 um eine Identifizierung auf Speziesebene, zwischen 1,7 und 2 auf Gattungsebene und bei unter 1,7 um keine eindeutige Identifikation (Anonymus 2012). Der mittlere Score Value der gefriergetrockneten Paprika (Trocknungszeitpunkt 0) betrug 1,07. Nach 3 und 5 Wochen Trocknung konnten Werte über 1,7 und nach 7 und 9 Wochen Trocknung Werte über 2 erreicht werden. Je länger die Paprika folglich im Trockenschrank getrocknet wurde, desto höhere Score Values konnten erzielt werden. Dies bedeutet, dass die Massenspektren dem Referenzspektrum immer ähnlicher wurden.

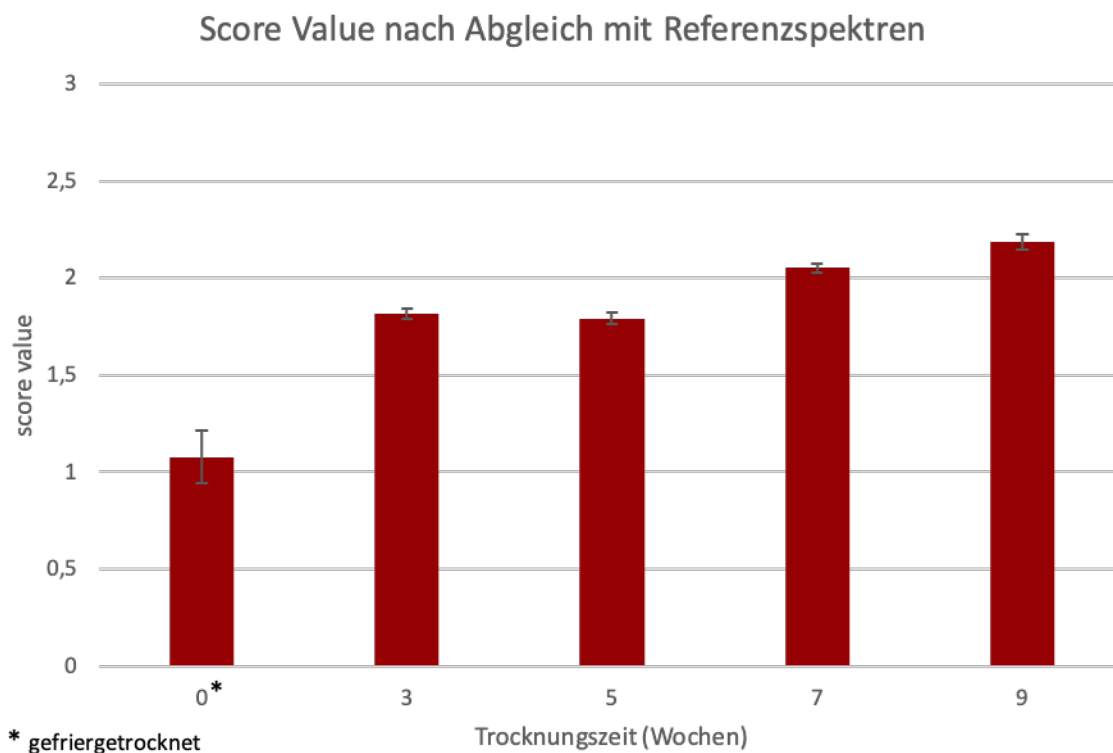


Abbildung 19: Mittlere Score Values (inkl. relativer Standardabweichung) der Massenspektren von unterschiedlich lang getrockneten Spitzpaprika (je 3 biologische und 3 technische Replikate) nach Abgleich mit einem Referenzspektrum von bereits getrockneter Gewürzpaprika

4.1.2.2 Einfluss einzelner Bestandteile von Paprika

Überprüft wurde, inwiefern die einzelnen Bestandteile der Paprikafrucht Einflüsse auf das Spektrum haben (vgl. 3.2.4.1). In Abbildung 20 sind die MALDI-TOF MS Spektren der extrahierten und gemessenen Bestandteile von Spitzpaprika dargestellt. Das Fruchtfleisch ohne und mit Exokarp und die Scheidewände (Abb. 20 B, C und D) lieferten sehr ähnliche Massenspektren. Abweichend davon war das Spektrum der Samen (Abb. 20 A). Dieses wies deutlich mehr und andere Massen vor allem in den Bereichen von 4000-7000 Da und 9000-10000 Da auf.

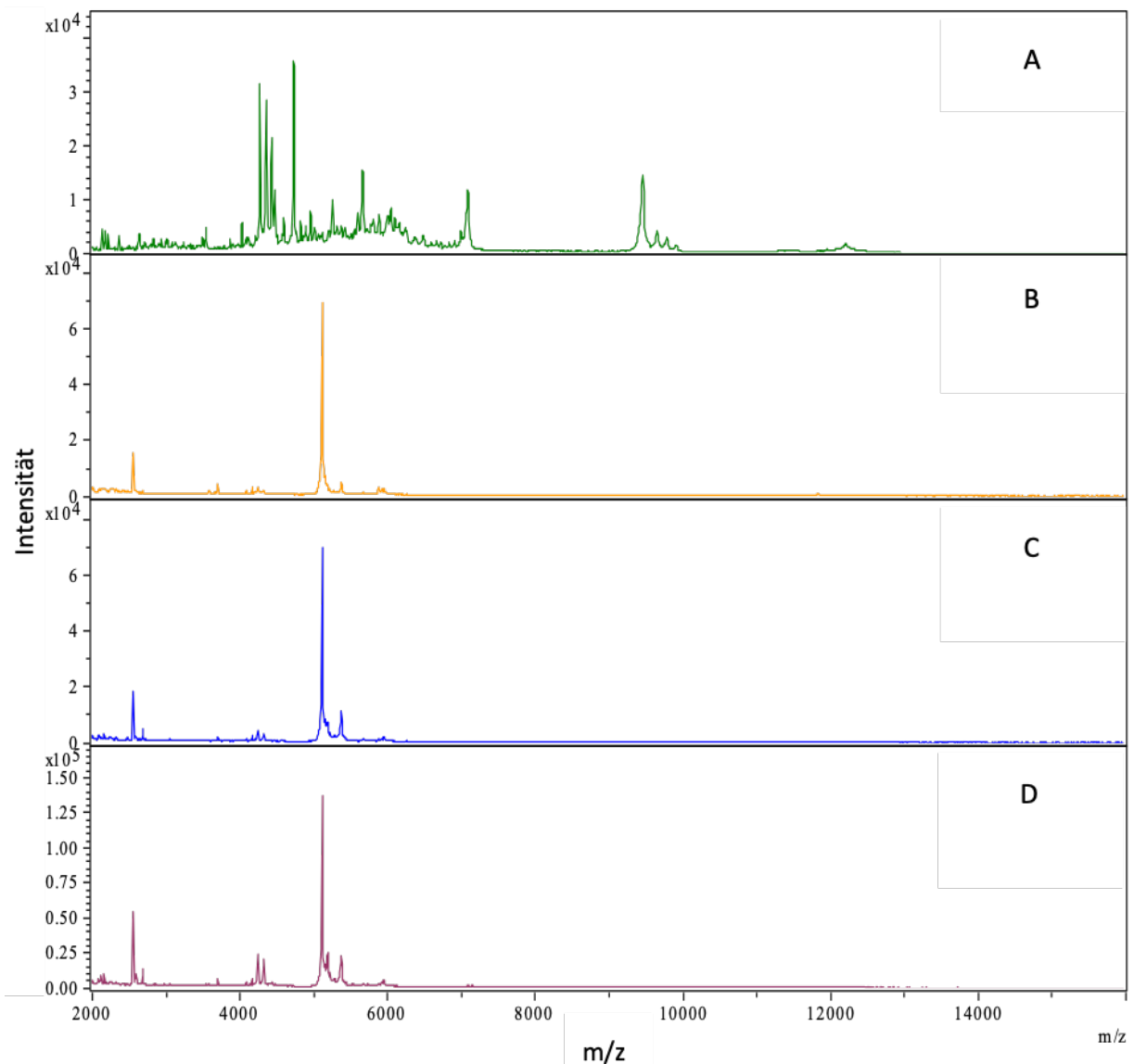


Abbildung 20: MALDI-TOF MS Spektren (2 - 16 kDa) der einzelnen Paprikabestandteile (A: Samen, B: Fruchtfleische ohne Exokarp, C: Fruchtfleisch mit Exokarp, D: Scheidewände)

4.1.2.3 Einfluss mikrobieller Kontamination von Paprika

Mikrobiologische Untersuchung:

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen von Paprika (vgl. 3.2.4.3) sind in Tabelle 30 dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 (30 Minuten nach Inokulierung) konnten Wiederfindungsraten von 78 % (*Pectobacterium carotovorum*) und 56 % (*Aspergillus niger*) erreicht werden (ursprüngliche Kontaminationshöhe: 1×10^4 KbE/g Paprika). Die Negativ-Kontrollen zeigten zu allen drei Zeitpunkten Kontaminationen mit *Bacillus cereus* und *B. pumilus*. Bei den festgestellten Keimzahlen (10^2 - 10^7) wurden keine sensorischen Abweichungen beobachtet (s. Abb. 21). Die Identifizierung der Mikroorganismen erfolgte zum Zeitpunkt 0 mittels MALDI-TOF MS und danach morphologisch.

Nach einer Woche konnte bei den Versuchsproben (Bakterium) eine fortgeschrittene Zersetzung des Paprikafruchtfleisches mit Flüssigkeitsaustritt beobachtet werden, die sich nach zwei Wochen ähnlich darstellte (s. Abb. 22). Bei den Versuchsproben mit *Aspergillus niger* war nach Woche 1 ein Schimmelpilzwachstum zu erkennen, das nach zwei Wochen deutlich ausgeprägt war. Zusätzlich war eine Schwarzfärbung der Sporen zu beobachten (s. Abb. 23). Beide Versuchsproben zeigten nach zwei Wochen Keimgehalte von über 10^{15} KbE/g (s. Tabelle 30).

Tabelle 30: Mikrobiologischer Status der Paprika zum Zeitpunkt 0 (30 Minuten nach Inokulierung), nach einer Woche und zwei Wochen Inkubation bei 25 °C

Proben	Keim	Keimzahl [KbE/g]		
		Zeitpunkt 0	Woche 1	Woche 2
Negativ-Kontrolle	<i>Bacillus</i> sp.	$6,0 \times 10^2$	$2,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^5$
Versuchsprobe (Bakterium)	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	$7,8 \times 10^3$	$1,9 \times 10^{10}$	$6,2 \times 10^{15}$
	<i>Bacillus</i> sp.	$1,0 \times 10^2$		
Versuchsprobe (Schimmelpilz)	<i>Aspergillus niger</i>	$5,6 \times 10^3$	$9,2 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{15}$

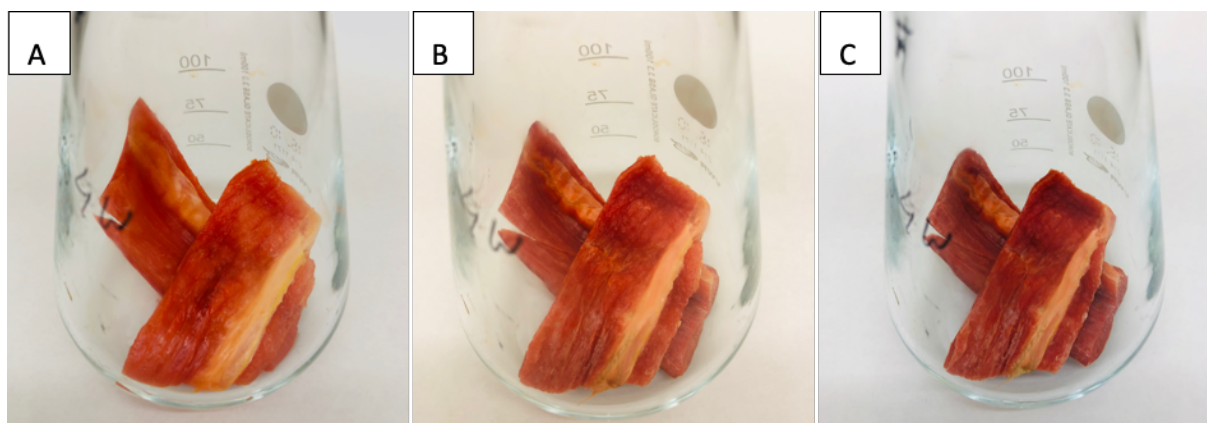


Abbildung 21: 10 g Spitzpaprika (Negativ-Kontrolle mit NaCl (0,9 %)) nach 0 (A), 1 (B) und 2 (C) Wochen im Brutschrank bei 25 °C

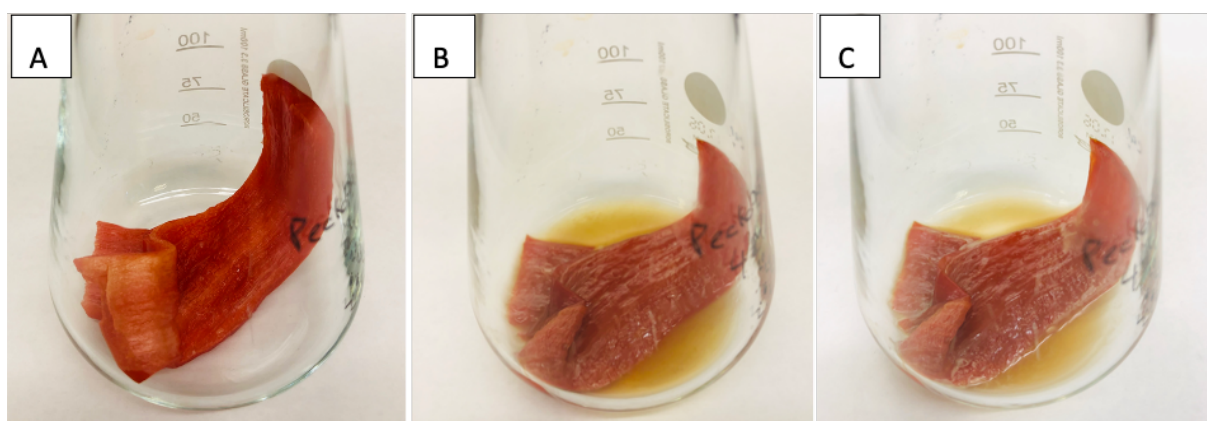


Abbildung 22: 10 g Spitzpaprika (Versuchsprobe mit *Pectobacterium carotovorum*) nach 0 (A), 1 (B) und 2 (C) Wochen im Brutschrank bei 25 °C

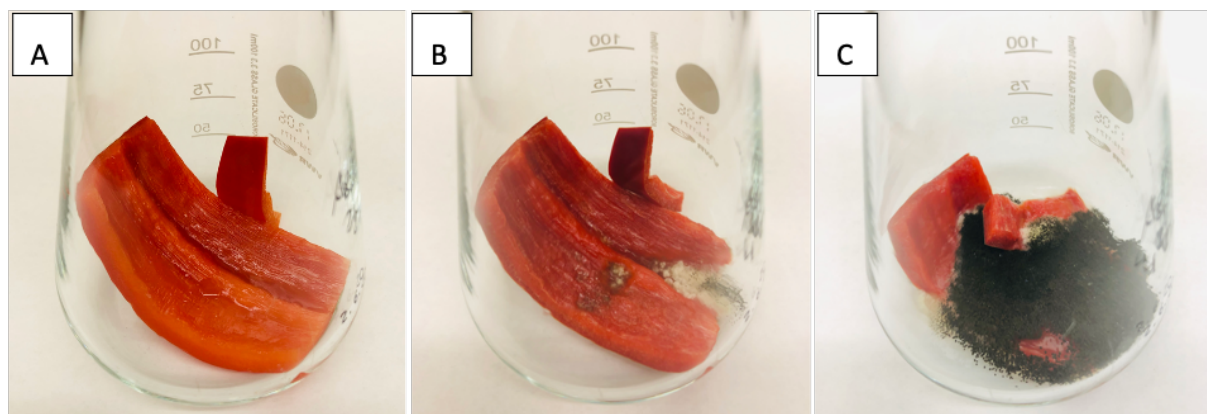


Abbildung 23: 10 g Spitzpaprika (Versuchsprobe mit *Aspergillus niger*) nach 0 (A), 1 (B) und 2 (C) Wochen im Brutschrank bei 25 °C

MALDI-TOF MS Messung

Die MALDI-TOF MS Spektren der kontaminierten Paprika (inkl. Negativ-Kontrolle) zum Zeitpunkt 0 sind in Abbildung 24 dargestellt. Bei beiden Versuchsproben waren keine Abweichungen der Massenspektren, verglichen mit der Negativ-Kontrolle, zu erkennen.

Nach einer Woche Inkubation zeigte das Massenspektrum der Versuchsprobe (Bakterium) erste Abweichungen in Form von verringerter Intensität und Anzahl der Massen verbunden mit einem erhöhten Rauschen der Grundlinie. Im Massenspektrum der Versuchsprobe (Schimmelpilz) trat ebenfalls ein geringgradig höheres Rauschen der Grundlinie auf (s. Abbildung 25).

Stärkere Abweichungen im Massenspektrum der Versuchsprobe (Bakterium) waren nach zwei Wochen zu erkennen. Die Intensität der Massen war im Gegensatz zur Negativ-Kontrolle um ca. 50 % verringert. Ein vermehrtes Rauschen und zusätzliche Massenpeaks im Bereich von 7-9 kDa waren zu erkennen. Bei der Versuchsprobe (Schimmelpilz) war analog zu Woche 1 ein erhöhtes Rauschen der Grundlinie und zusätzlich eine deutliche Intensitätsabnahme einiger Massenpeaks zu erkennen (bei ca. 2,6 und 5,5 kDa) (s. Abb. 26).

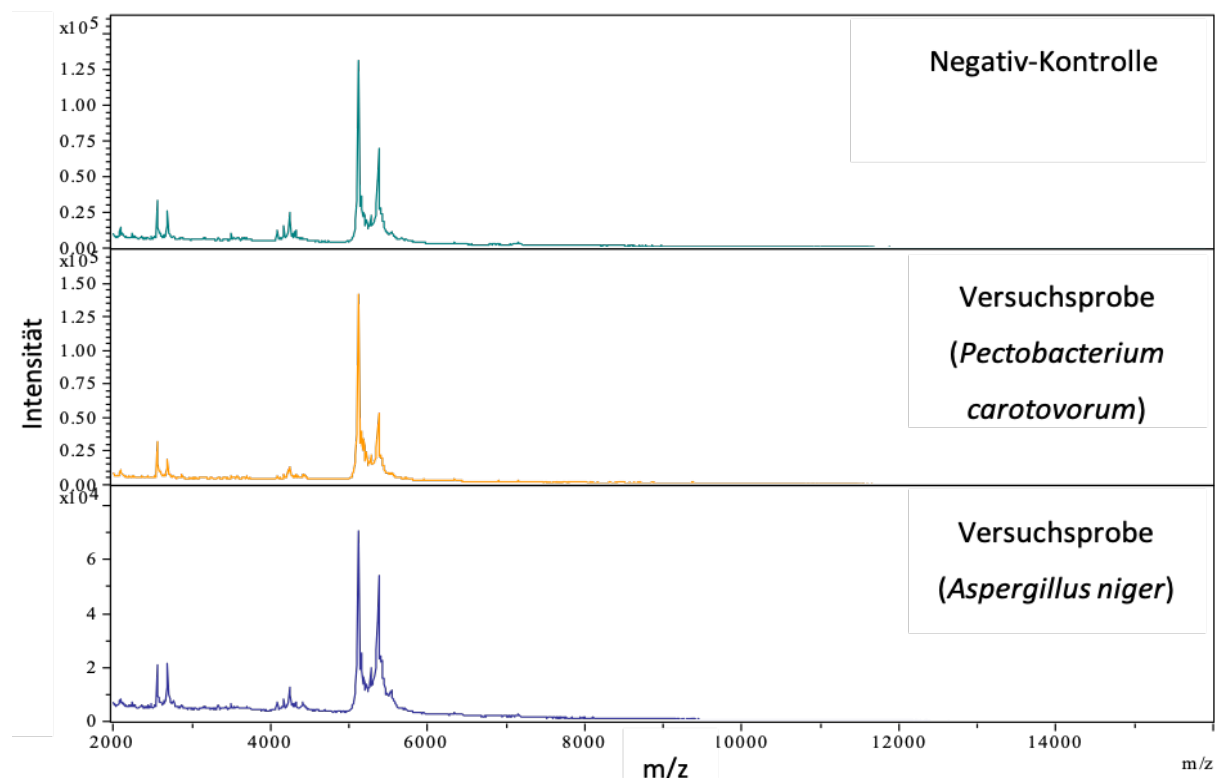


Abbildung 24: MALDI-TOF MS Spektren von mikrobiell kontaminierter Paprika 30 min. nach Inokulierung (Zeitpunkt 0)

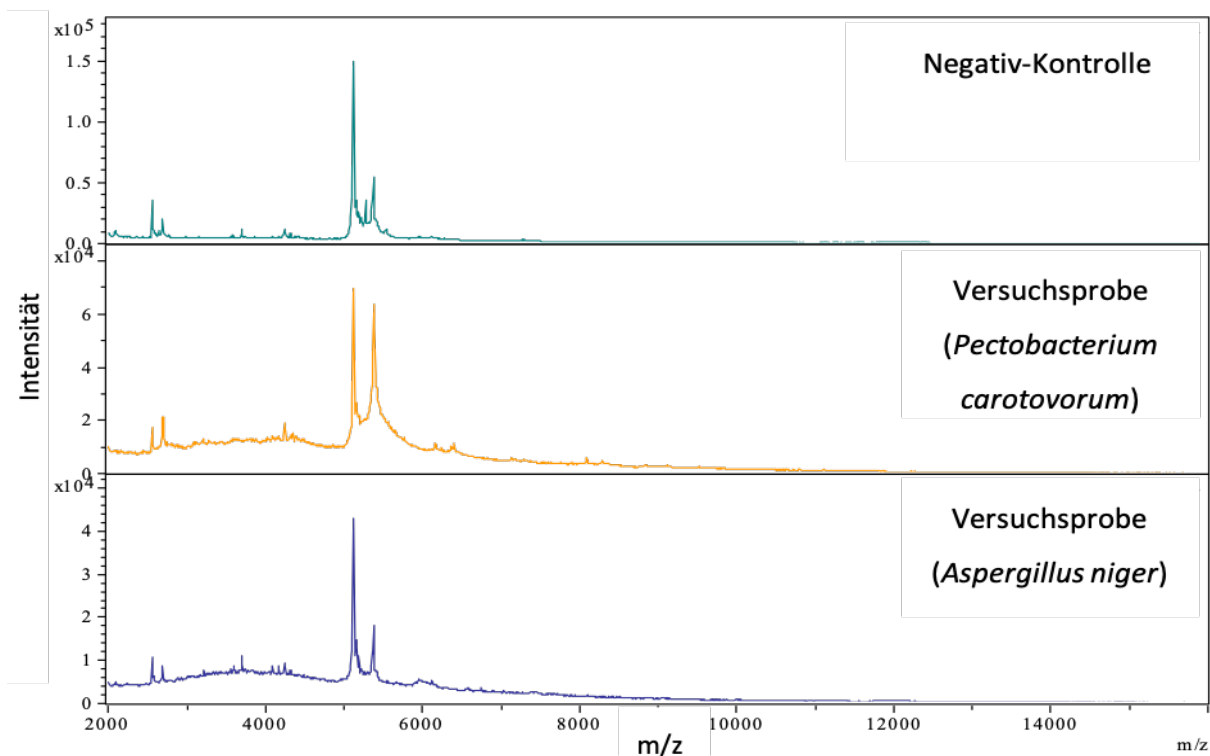


Abbildung 25: MALDI-TOF MS Spektren von mikrobiell kontaminierter Paprika nach einer Woche Inkubation

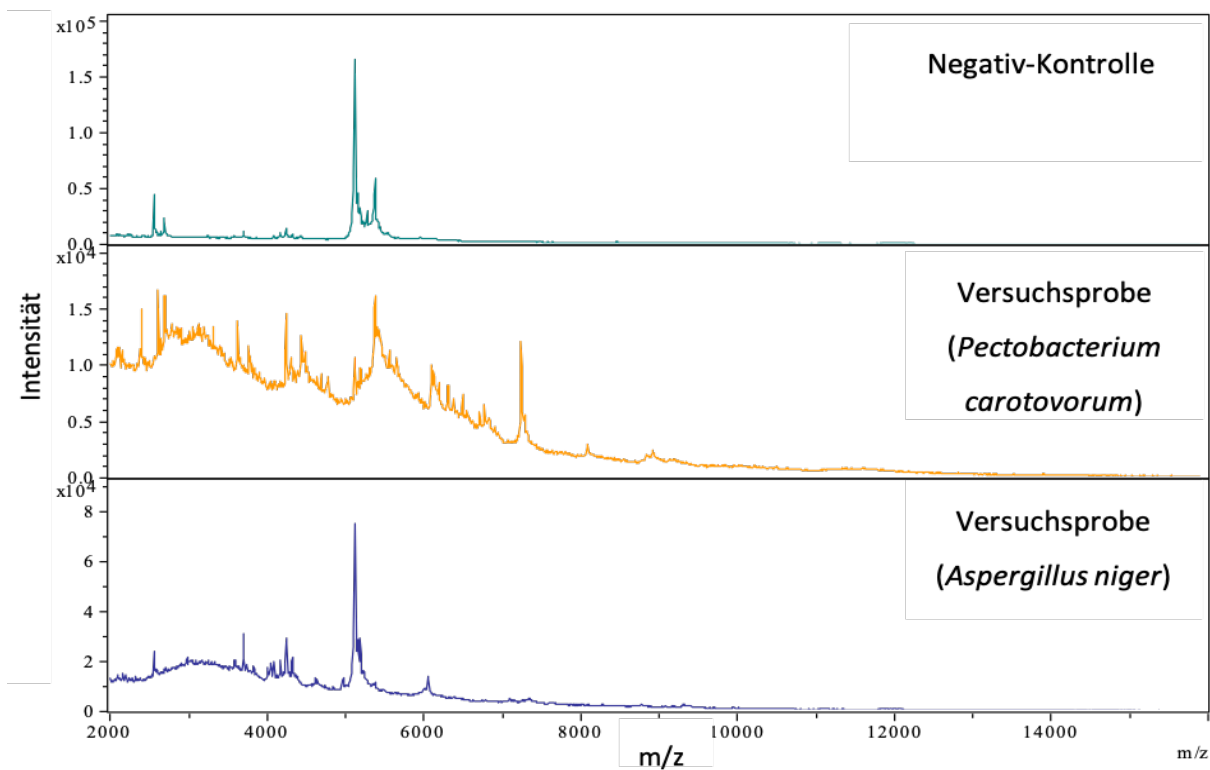


Abbildung 26: MALDI-TOF MS Spektren von mikrobiell kontaminierter Paprika nach zwei Wochen Inkubation

Der Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit einem Referenzspektrum von Spitzpaprikafruchtfleisch mittels der Software Biotyper Compass Explorer (4.1) ergab, dass die Score Values beider Versuchsproben im Laufe der zwei Wochen abnahmen. Alle erhaltenen Score Values sind in nachfolgendem Diagramm dargestellt (Abbildung 27). Die Score Values der Negativ-Kontrollen lagen zu allen drei Zeitpunkten über 2,2. Die Werte der Versuchsproben lagen anfangs ebenfalls über 2,2, veränderten sich dann nach einer Woche auf 1,8 (Bakterium) bzw. 2,1 (Schimmelpilz) und sanken schließlich auf 1,0 (Bakterium) bzw. 1,8 (Schimmelpilz).

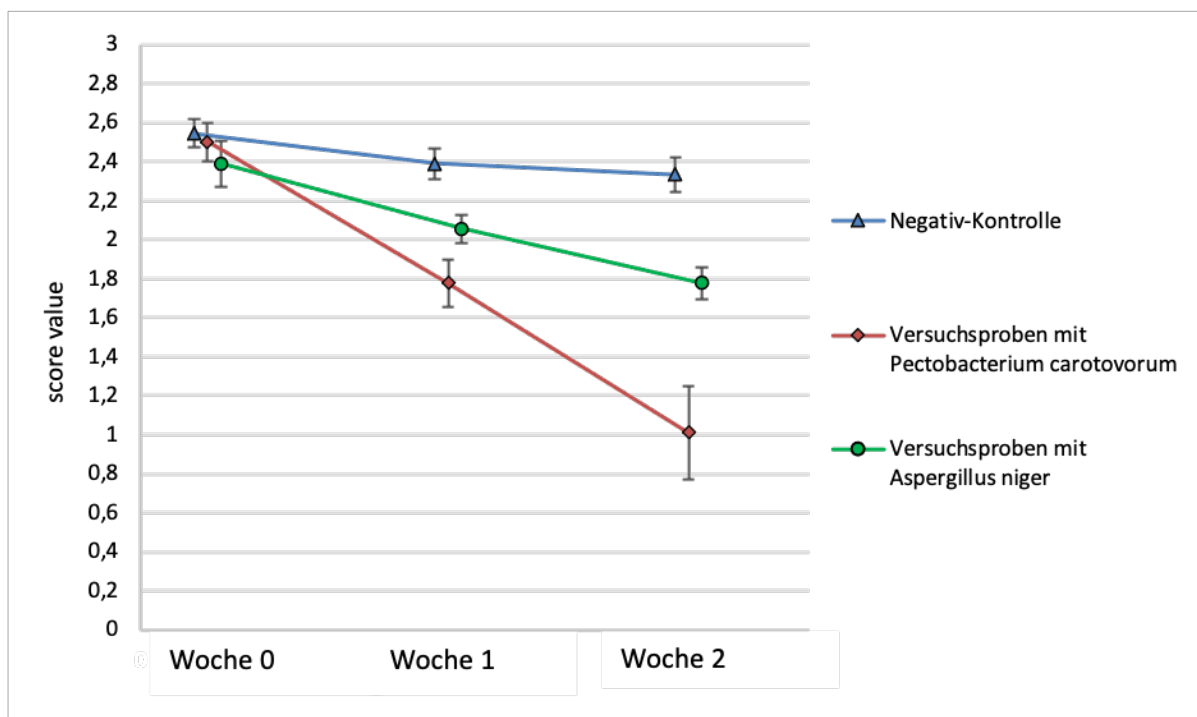


Abbildung 27: Mittlere Score Values der Massenspektren von kontaminierter Spitzpaprika (inkl. Negativ-Kontrolle) nach Abgleich mit einem Referenzspektrum von frischer gefriergetrockneter Spitzpaprika, jeweils Mittelwert aus 9 Werten inkl. Standardabweichung

4.1.2.4 Einfluss durch Sortenunterschiede

Von jeder Paprikasorte konnten reproduzierbare MALDI-TOF MS Spektren des Fruchtfleisches generiert werden. In der Pseudo-Gelansicht sind jeweils 9 Massenspektren pro Paprikasorte untereinander abgebildet (Abbildung 28). Die Dichteskala zeigt die Intensität der Massenpeaks an (je dunkler, desto höher die Intensität). Die Massenspektren von Spitzpaprika, Peperoni, Habanero, Chili 1 und 2 wiesen alle eine große Ähnlichkeit mit geringen Abweichungen auf. Diese waren in Form von unterschiedlichen Intensitäten einiger Massenpeaks zu erkennen. Mäßig abweichend stellte sich das Spektrum der Jalapeño dar. Im Massenbereich von 3,5-4,5 kDa und 5,5-6 kDa zeigten sich die Unterschiede in Form von mehreren zusätzlichen Massenpeaks und unterschiedlichen Intensitäten. Die zugehörigen Massenspektren sind im Anhang hinterlegt (Abbildung 62).

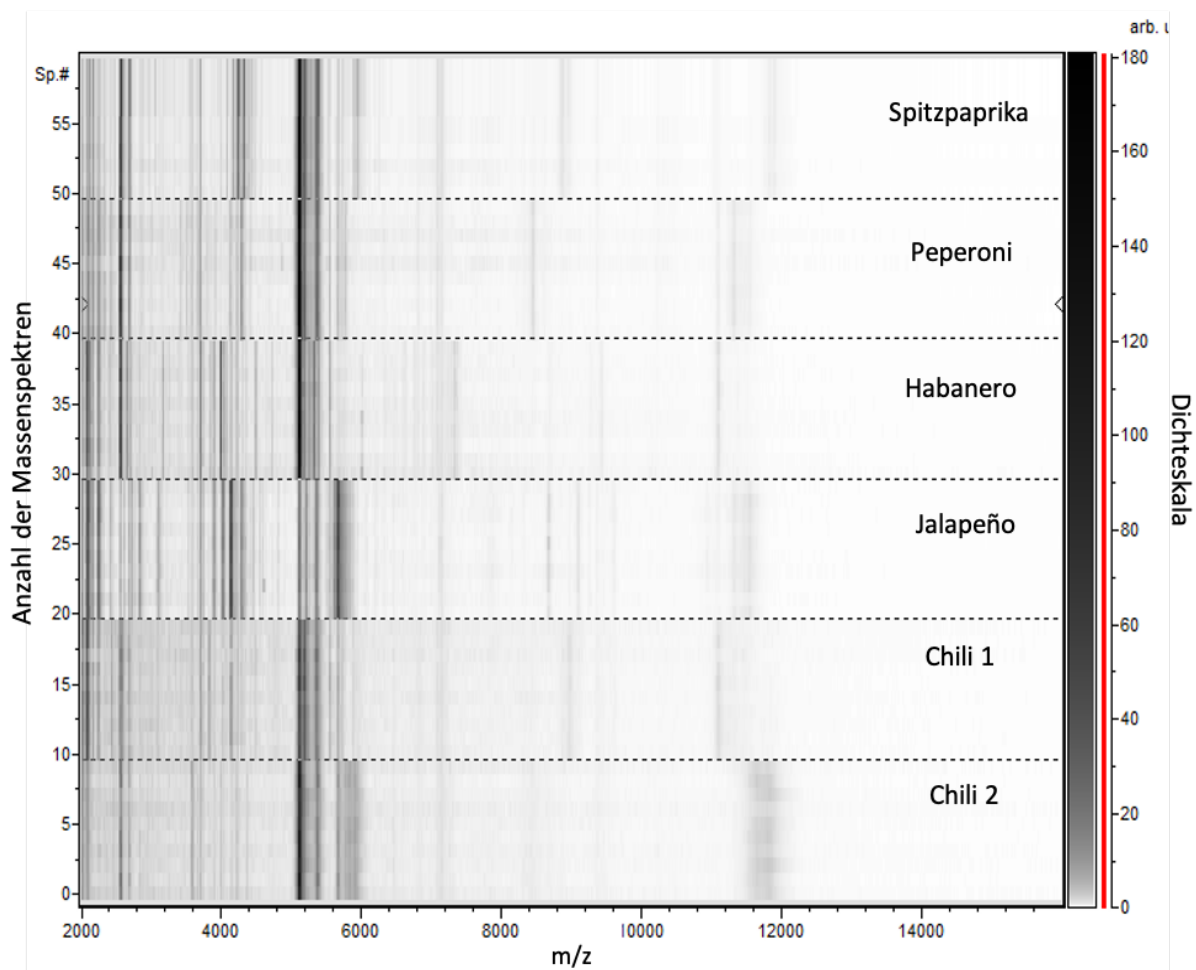


Abbildung 28: Gel-Ansicht der MALDI-TOF MS Spektren (2 - 16 kDa) sechs verschiedener Paprikasorten, pro Sorte 9 Massenspektren (3 biologische und je drei technische Replikate), erstellt mittels der Software Clinpro Tools (Bruker Daltonik)

Von jeder Sorte wurden Referenzspektren erstellt und in der internen Datenbank gespeichert. Mittels eines Dendrogramms wurde anschließend die hierarchische Clusterung dieser Referenzspektren visualisiert (Abbildung 29). Als externe Kontrollprobe zur besseren Relativierung der Datensätze wurde ein stark abweichendes Spektrum miteinbezogen. In dieser Arbeit wurde der Datensatz des Insekts Buffalowurm (aus Daten des Lehrstuhls) verwendet.

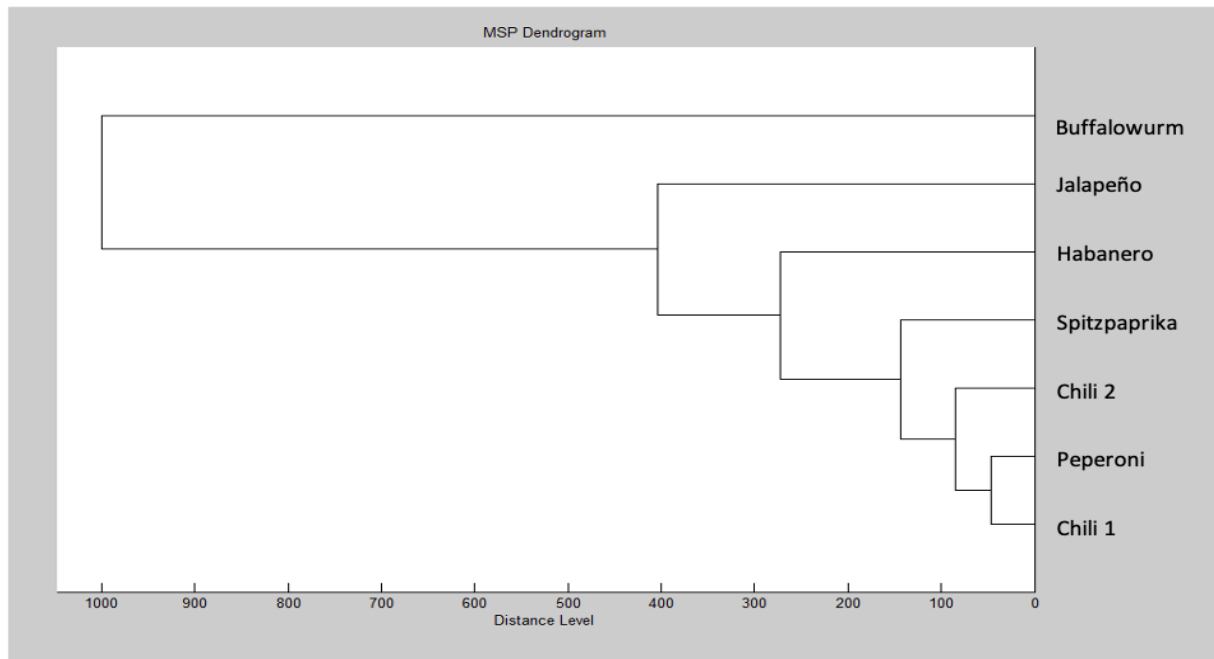


Abbildung 29: Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von verschiedenen Paprikasorten und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte

Die Datensätze der Paprikasorten bildeten das untere relevante Cluster, das mit einem Distanzlevel von > 950 deutlich von dem Cluster der externen Kontrollprobe unterschieden werden konnte. Das Cluster der Paprikasorten konnte in mehrere Subcluster unterteilt werden, welche geringere, aber deutlich unterscheidbare Distanzlevel (ca. 30-300) aufwiesen, wodurch sich die Paprikasorten weitgehend voneinander abgrenzen ließen.

4.1.3 Erstellung von Referenzspektren mittels MALDI-Biotyper

Die Erstellung von Referenzspektren, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, erfolgte für fünf authentische Gewürzpaprika (vgl. 3.1.1) mit Samenanteilen von jeweils 0, 5, 15, 25 und 50 %. Jedes MSP wies nach Abgleich mit den verwendeten Massenspektren Score Values von über 2,5 auf und konnte somit als qualitativ gut bewertet werden.

Folgendes Dendrogramm (Abbildung 30) zeigt die Ähnlichkeit zwischen den fünf verschiedenen Gewürzpaprika mit 0 % Samenanteil. Wie zu erwarten waren die Referenzspektren der Gewürzpaprika mit Distanzleveln < 10 nicht voneinander abgrenzbar. Sie bildeten ein gemeinsames Cluster, das mit einem Distanzlevel von 100 eindeutig von der externen Kontrollprobe (Buffalowurm) unterschieden werden konnte.

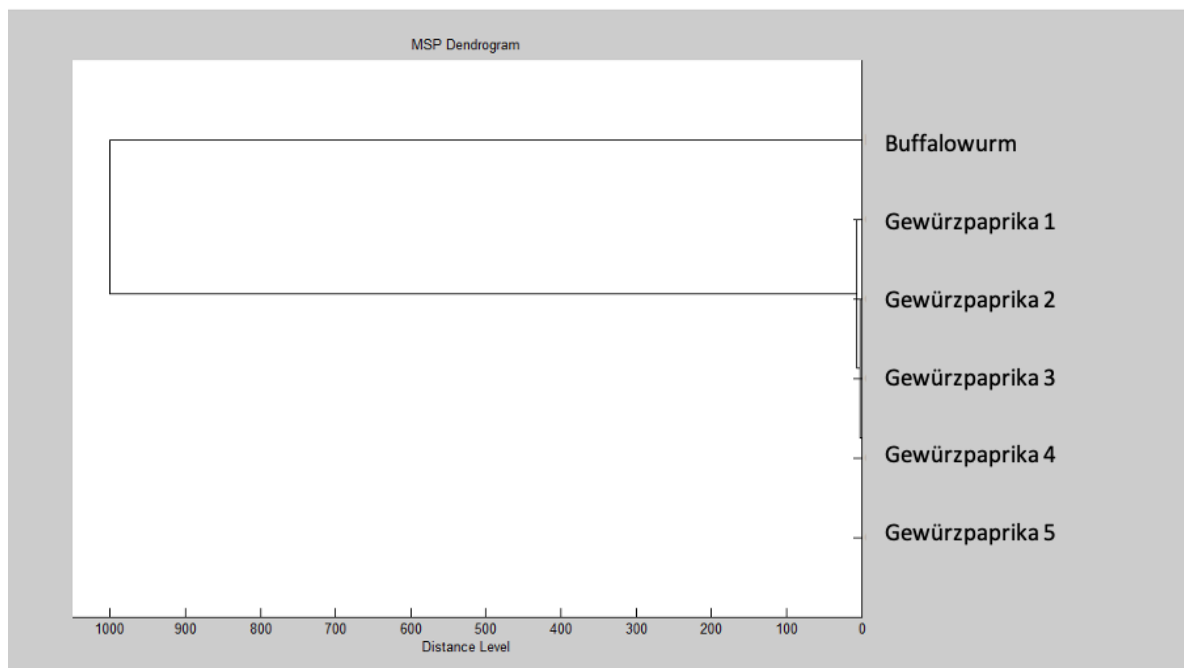


Abbildung 30: Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von fünf verschiedenen Gewürzpaprika (excl. Samen) und Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte

4.1.4 Detektion von Produktverfälschungen

Um Verfälschungen herzustellen, wurden definierte Anteile von gemahlene Tomatenschalen und von gemahlener Gewürzpaprika (excl. Samen) gemischt und nach der entwickelten Extraktionsmethode (s. 3.2.5 und 4.1) aufgearbeitet. In Abbildung 31 sind jeweils die unterschiedlichen Beimischungsverhältnisse von 95/5 bis 50/50 (w/w) sowie die Reinspektren von Gewürzpaprika und Tomatenschalen dargestellt.

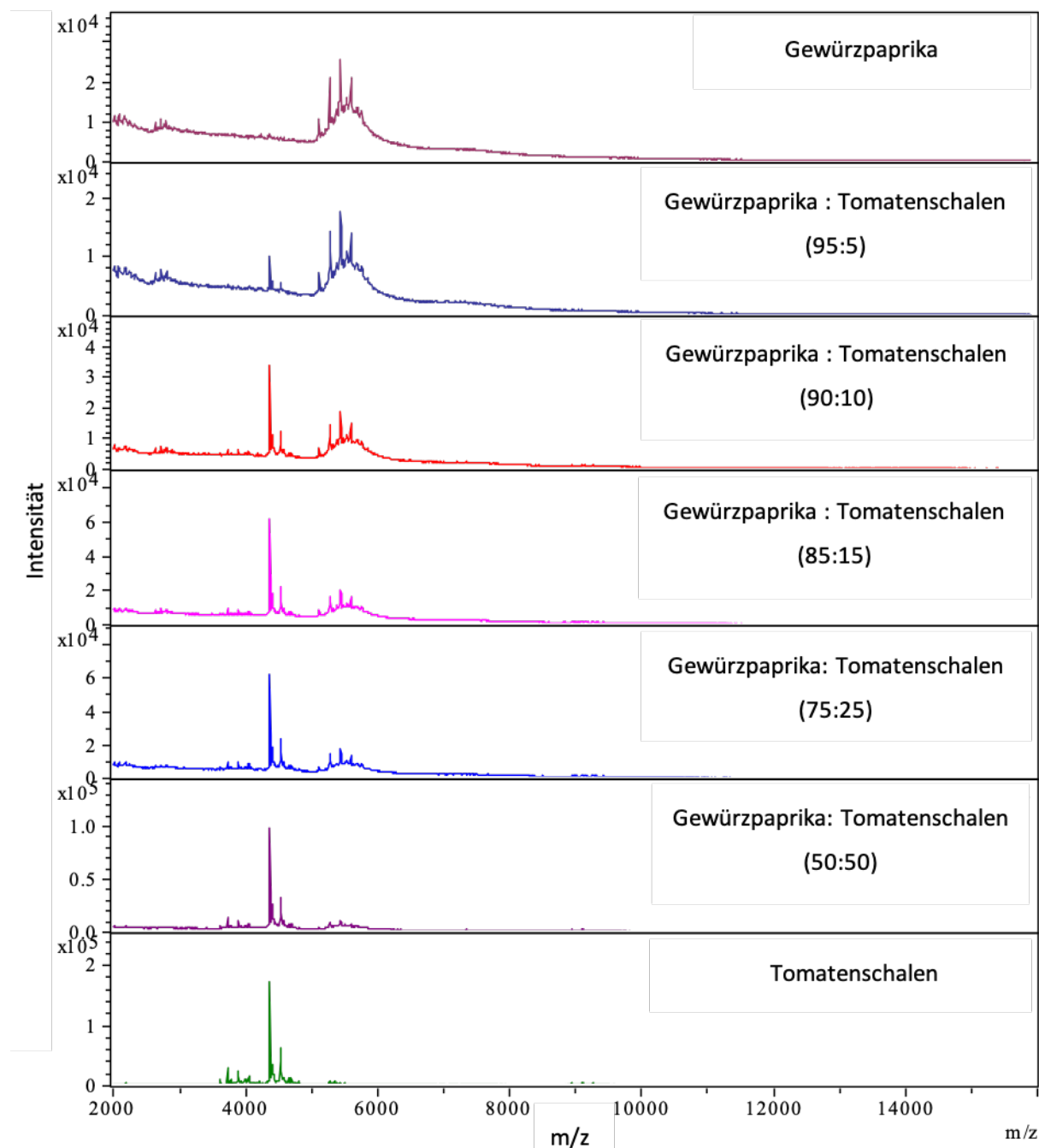


Abbildung 31: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Gewürzpaprika artifiziell verfälscht mit Tomatenschalen (Verhältnisse in *weight per weight* (w/w))

Das Spektrum von reiner Gewürzpaprika ohne Samen wies insgesamt 65 Massen (Mittelwert aus $n = 9$) auf. Bereits ab einer Verfälschung von 5 % waren zusätzliche Massenpeaks mit Intensitäten von ca. 1×10^4 in einem Bereich von ca. 4300 bis 4600 Da zu erkennen (Abbildung 32). Deren Intensitäten erhöhten sich mit steigendem Verfälschungsgrad. Das Reinspektrum der Tomatenschalen wies durchschnittlich 90 Massen auf.

Von jeder Verfälschung (Tomatenschalenanteil 5-50 %, w/w) wurden anschließend mittels der Software Biotyper Compass Explorer (4.1) Referenzspektren erstellt und in die interne Datenbank eingelesen. Die Massenspektren aller Proben wurden anschließend mit Referenzspektren von authentischer Paprika (rot) und zusätzlich mit dem MSP des jeweiligen Verfälschungsgrades (grün) abgeglichen (Abbildung 32). Je größer die Differenz zwischen den beiden erhaltenen Score Values war, desto sicherer war auch die richtige Identifikation. Bei einer Verfälschung von 5 % lag die Differenz bei 0,18 und erhöhte sich mit steigendem Verfälschungsgrad auf bis zu 0,9 (50 % Tomatenschalenanteil).

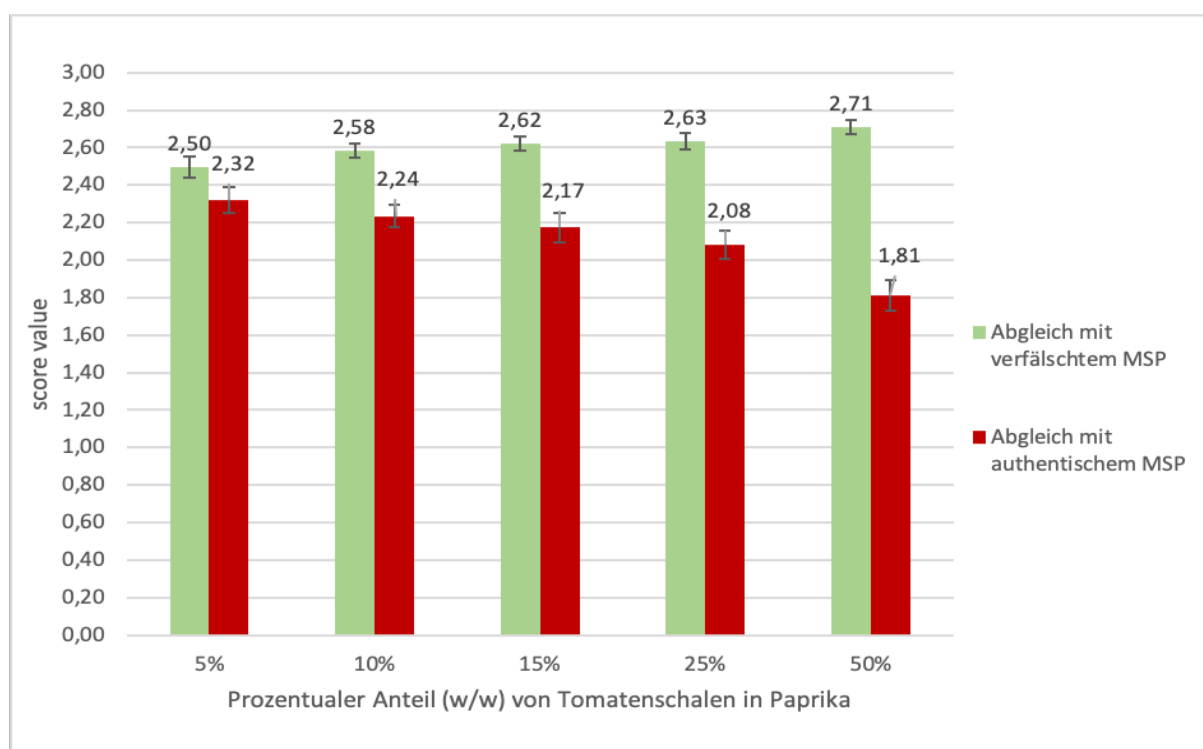


Abbildung 32: Mittlere Score Values von artifiziell verfälschter Paprika nach Abgleich mit dem MSP von authentischer Paprika (rot) und dem MSP des jeweiligen Verfälschungsgrades (grün); jeweils Mittelwert aus 20 Werten inkl. Standardabweichung; Unterschiede in der Zuordnung zu den MSPs waren für alle Verfälschungen hoch signifikant ($P < 0,01$; Mann-Whitney Rangsummentest)

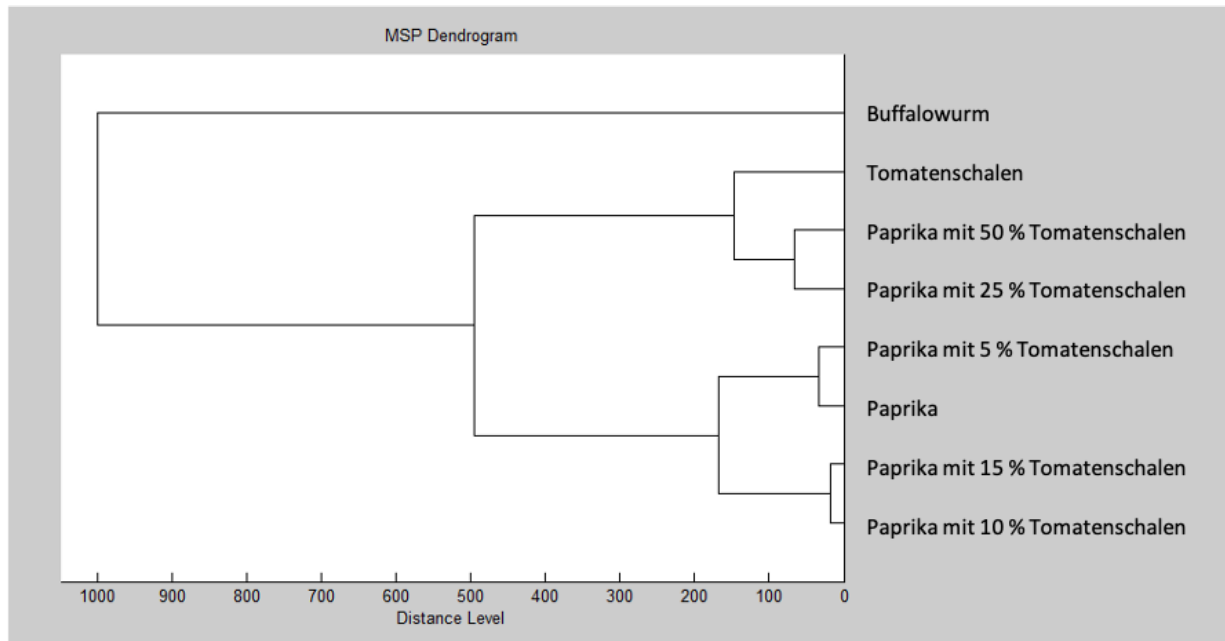


Abbildung 33: Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von Gewürzpaprika (excl. Samen), Tomatenschalen und deren Mischungen und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte

Mittels eines Dendrogramms in Abbildung 33 wurden die erstellten Referenzspektren nach ihrer Ähnlichkeit hierarchisch geclustert. Die Datensätze von Paprika, Tomatenschalen und Mischungen aus beiden bildeten das untere relevante Cluster, welches mit einem Distanzlevel von > 950 deutlich von dem Cluster der externen Kontrollprobe (Buffalowurm) unterschieden werden konnte.

Das untere Cluster konnte in mehrere Subcluster unterteilt werden. Diese wiesen geringere, aber deutlich unterscheidbare Distanzlevel (ca. 30-500) auf, wodurch sich die Mischungen und die reinen Proben weitgehend voneinander abgrenzen ließen. Je höher der Anteil der Tomatenschalen in Paprika war, desto größer war auch das Distanzlevel zum Datensatz der reinen Paprika.

4.1.5 Messung von Realproben

Zehn Paprika-Gewürzproben (1-10) aus dem Handel (vgl. 3.1.1) wurden, wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben, extrahiert, mittels MALDI-TOF MS gemessen und mit den bisher erstellten Referenzspektren abgeglichen. Die Massenspektren sind in Abbildung 34 und 35 dargestellt. Die Score Values wurden gemittelt und bei Werten über 1,7 zusammen mit dem zugehörigen MSP ebenfalls in folgenden Abbildungen aufgelistet.

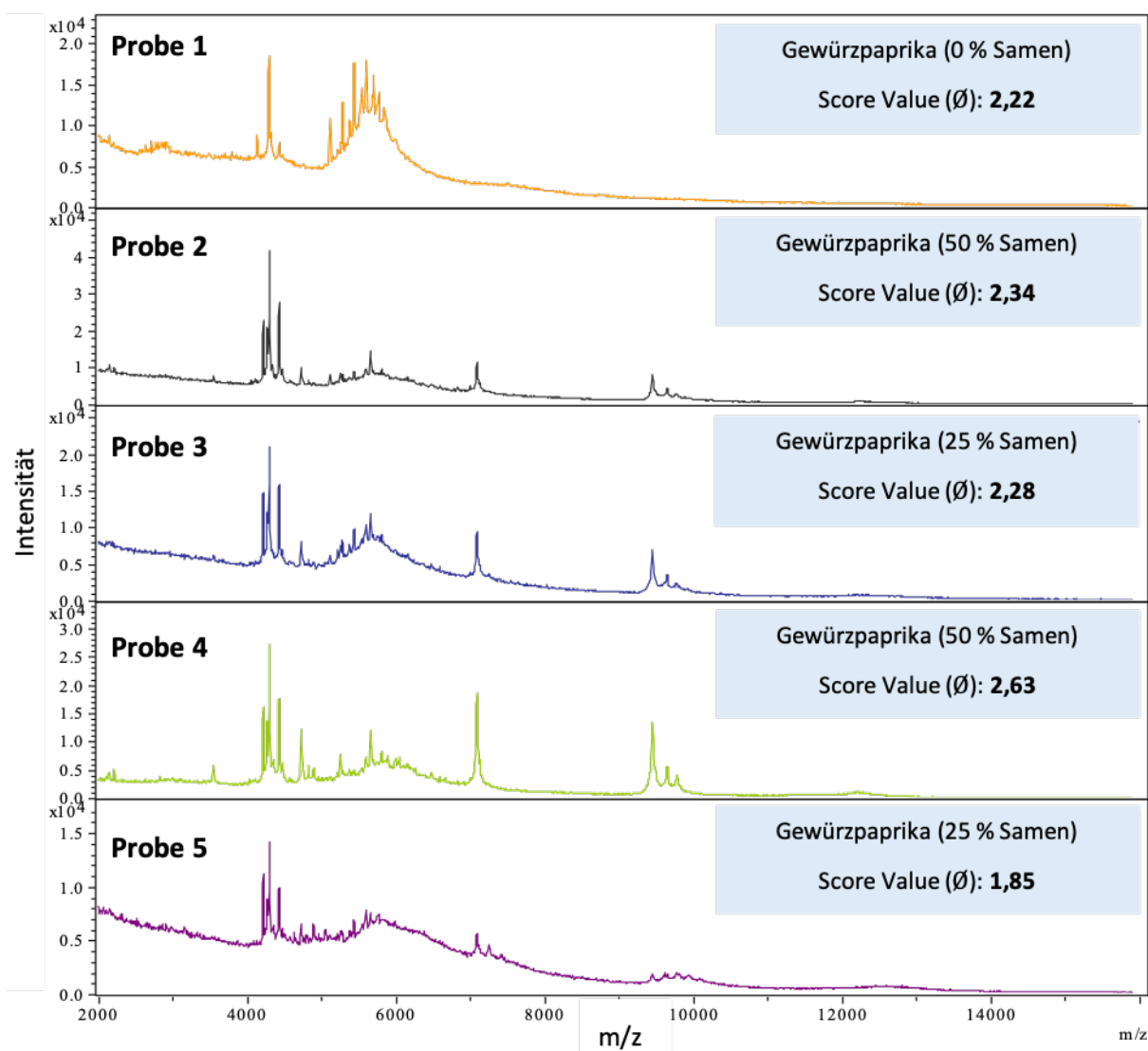


Abbildung 34: MALDI-TOF MS Spektren der Paprikaproben Nr. 1-5, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (Ø aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1

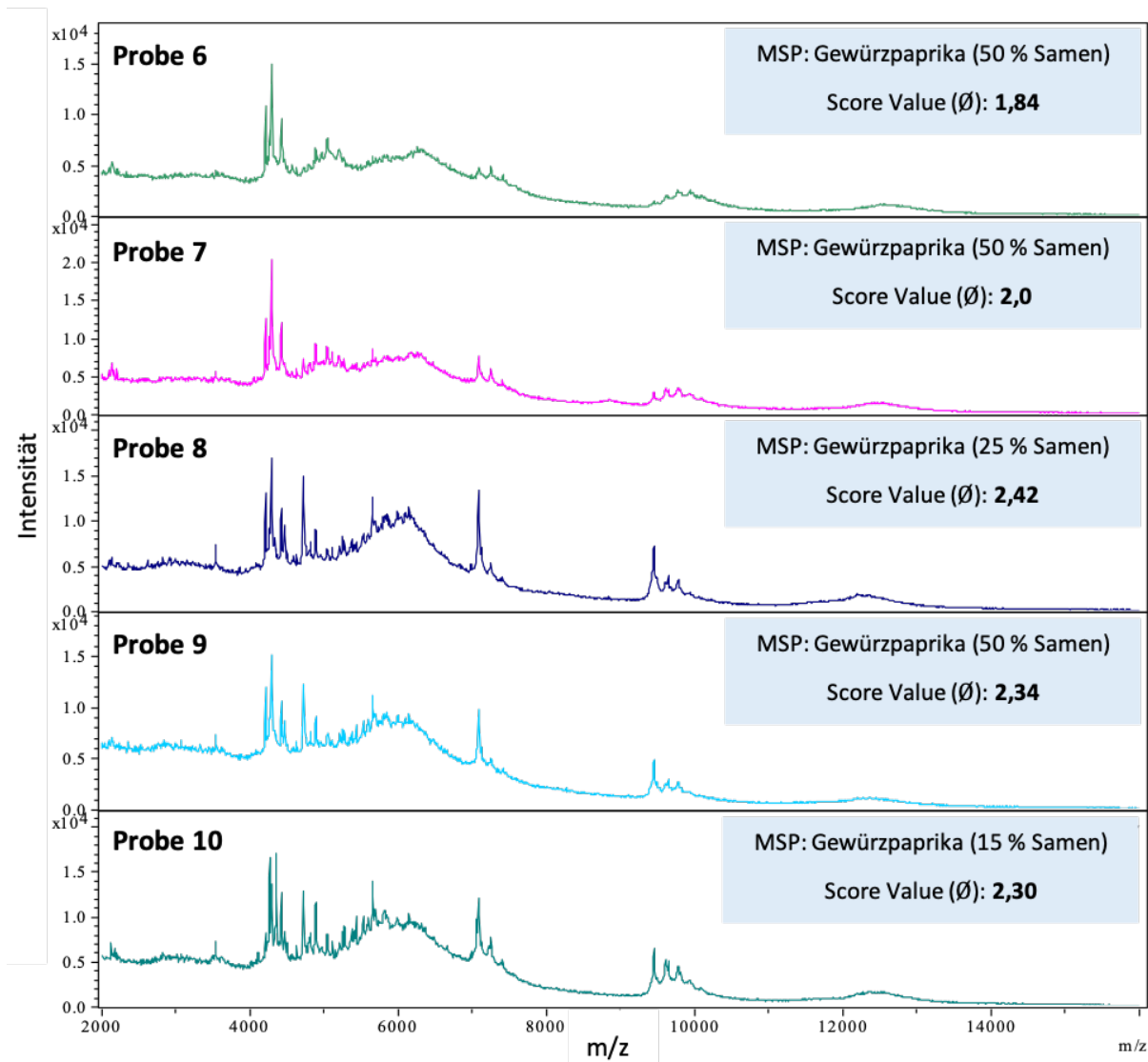


Abbildung 35: MALDI-TOF MS Spektren der Paprikaproben Nr. 5-10, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1

Für die Massenspektren der Proben 1-4 und 7-10 konnten nach dem Abgleich mit Referenzspektren (MSPs) Score Values von über 2 erreicht werden, bei den Proben 5 und 6 Werte zwischen 1,7 und 2. Die Paprikaprobe 1 stimmte als einzige mit einem MSP von Gewürzpaprika ohne Samen überein. Die Spektren der restlichen Proben zeigten Übereinstimmungen mit MSPs von Gewürzpaprika mit 15-50 % Samen.

4.2 Oregano

4.2.1 Entwicklung und Optimierung einer Extraktionsmethode

Mit der Extraktionsmethode A (vgl. 3.2.1) konnten keine mittels MALDI-TOF MS messbaren strukturellen Bestandteile von Oregano zwischen 2000 Da und 16000 Da extrahiert werden. Es fiel ein sehr hohes Rauschen im niedrigen Massenbereich auf, ohne erkennbare spezifische Massenpeaks (Abbildung 36).

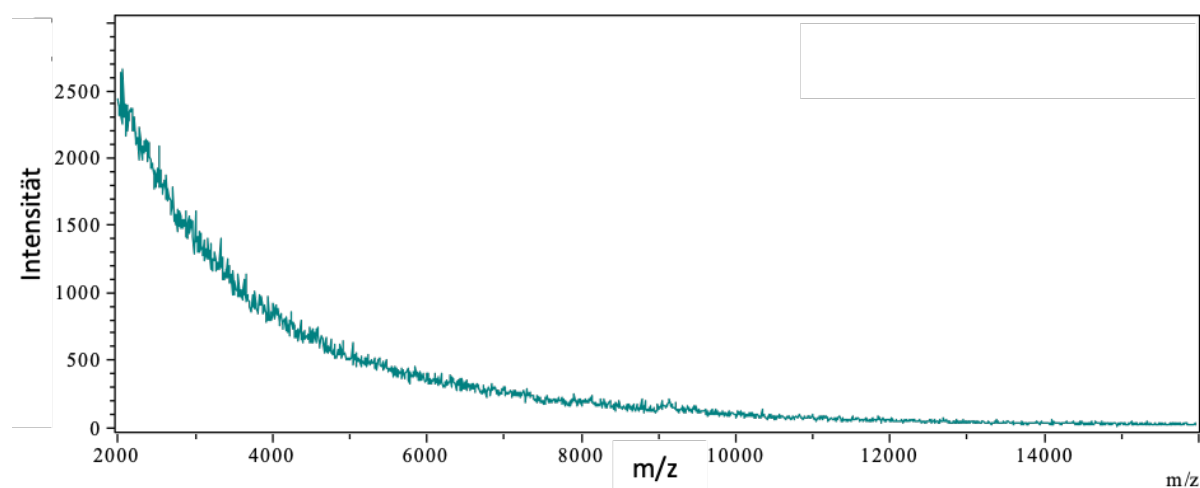


Abbildung 36: MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Oregano, extrahiert nach der Methode A (vgl. 3.2.1)

4.2.1.1 Waschen des Oregano mit verschiedenen Waschlösungen

Durch einmaliges Waschen des Oregano und anschließender Extraktion konnten erste spezifische Massenpeaks generiert werden. Mit dem Lösungsmittel TCA/Aceton (1/9, v/v) waren dies im Schnitt 63 Massen mit einer RSD von 17 %. Das Spektrum zeigte jedoch vor allem im niedrigen Massenbereich immer noch ein hohes Rauschen (Abbildung 63 im Anhang). Jeder weitere Waschschrift erhöhte die Massenausbeute, senkte die RSD und erhöhte die S/N-Verhältnisse (Tabelle 31). Die besten Ergebnisse hinsichtlich der Qualitätskriterien konnten mit einer Kombination von TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton erreicht werden. Das Rauschen im niedrigen Massenbereich war jedoch immer noch vorhanden (Abbildung 37).

Tabelle 31: Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Oregano nach Waschen mit verschiedenen Lösungsmittelkombinationen**Einmaliges Waschen:**

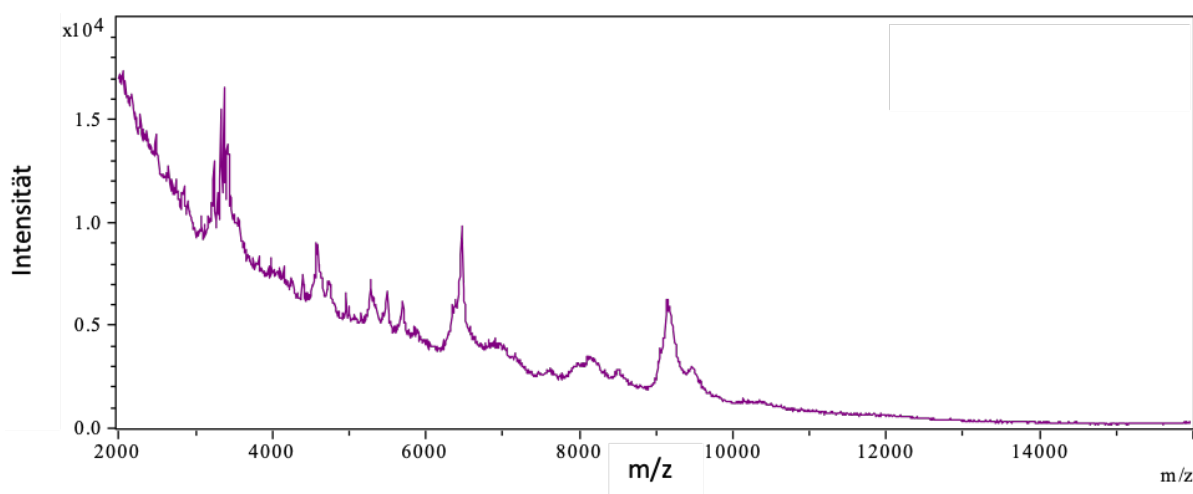
Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
Ethanol	53	16	5-26
Aceton	52	19	8-27
TCA/Aceton (1/9, v/v)	63	17	7-30
Methanol	49	18	5-27

Zweimaliges Waschen:

1. Waschlösung	2. Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Ethanol	65	25	7-20
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Aceton	66	32	4-13
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Methanol	92	12	6-21

Dreimaliges Waschen:

1. Waschlösung	2. Waschlösung	3. Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Methanol	Aceton	117	8,9	11-46
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Methanol	Ethanol	119	9,2	4-30

**Abbildung 37:** MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Oregano nach dreimaligem Waschen mit TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton

Die Verwendung der Waschlösungen nach der Extraktionsmethodik von Wang. et al. führte erstmals zu einer Erhöhung der S/N-Verhältnisse auf über 80. Mit den in Tabelle 32 beschriebenen Kombinationen von Lösungsmitteln konnte das S/N-Verhältnis deutlich erhöht und auch das Rauschen gesenkt werden (s. Abbildung 38). Die Kombination von Methanol (80 %) mit 0,1 M Ammoniumacetat führte jedoch zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit der Zahl der Massenpeaks (RSD von 15 %). Ohne Zugabe von Ammoniumacetat konnten die besten Ergebnisse hinsichtlich der Massenzahl, der RSD und den S/N-Verhältnissen erzielt werden.

Tabelle 32: Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Oregano nach Abwandlung der Extraktionsmethode von Wang et al. (2006)

1. Waschschrift	2. Waschschrift	3. Waschschrift	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Methanol (80 %) + 0,1 M Ammoniumacetat	Aceton (80 %)	118	15	17-89
TCA/Aceton (1/9, v/v)	Methanol (80 %)	Aceton (80 %)	120	7,8	19-83

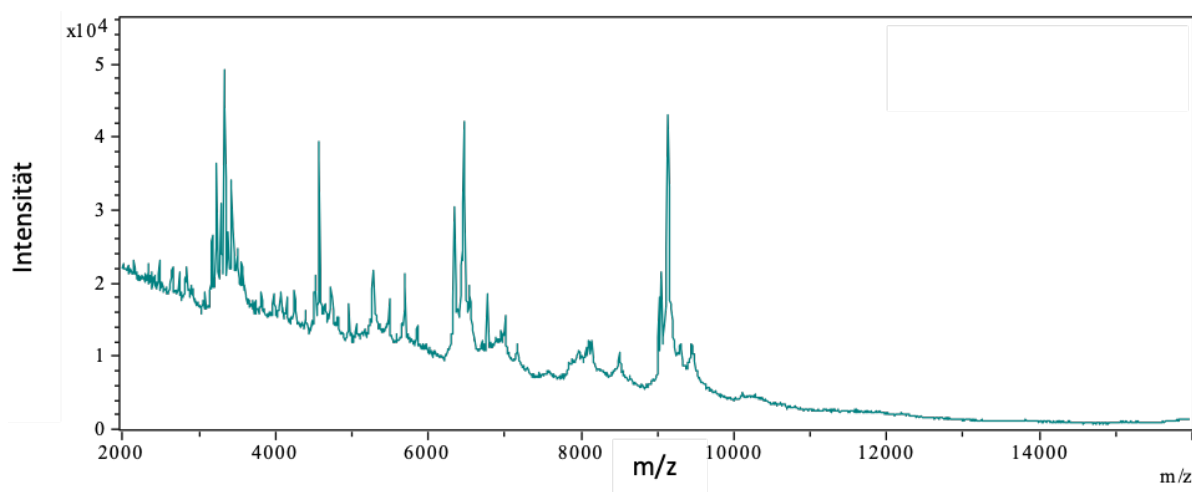


Abbildung 38: MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Oregano nach dreimaligem Waschen mit TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol (80 %) und Aceton (80 %)

4.2.1.2 Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

Verschiedene Volumenverhältnisse der drei Extraktionsmittel Reinstwasser, Ameisensäure (70 %) und Acetonitril wurden untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Mit einem Verhältnis der drei Extraktionsmittel von 1:1:1 (Tabelle 33 A) konnten durchschnittlich 119 Massen mit einer RSD von 7,3 % generiert werden. Die Tests, die zu einer RSD der Massen über 10 % führten, wurden wegen schlechter Reproduzierbarkeit vernachlässigt. Bei den Tests F, H und J konnte eine hohe Massenanzahl (> 110) jeweils mit einer RSD von unter 10 % detektiert werden. Jedoch wiesen alle drei um ca. die Hälfte niedrigere S/N-Verhältnisse als die Spektren aus Test A auf. Wo nur Reinstwasser und Acetonitril als Extraktionsmittel verwendet wurden, konnten wie schon bei Paprika keine auswertbaren Massenspektren generiert werden.

Tabelle 33: Ergebnisse nach Änderung der Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

Test	Reinst- wasser [μl]	Acetonitril [μl]	Ameisensäure (70 %) [μl]	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
A	500	500	500	119	7,3	18-87
B	–	1000	500	124	14	12-55
C	250	750	500	127	21	13-41
D	750	250	500	145	35	8-35
E	1000	–	500	106	16	9-34
F	–	500	1000	113	4,4	9-35
G	250	500	750	111	11	14-51
H	750	500	250	127	3,6	9-44
I	1000	500	–	–	–	
J	500	–	1000	116	9,1	8-38
K	500	250	750	130	30	9-44
L	500	750	250	111	25	9-40
M	500	1000	–	–	–	–

4.2.1.3 Variation der Probeneinwaage

Bei allen vier untersuchten Einwaagen von Oregano konnten über 110 Massen mit RSDs von unter 10 % generiert werden. Die S/N-Verhältnisse waren bei der Einwaage von 20 mg am höchsten (Tabelle 34).

Tabelle 34: Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Oregano

Probeneinwaage [mg]	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
10	114	7,5	11-60
15	120	9,2	12-58
20	123	7,2	14-81
50	131	7,4	10-71

4.2.1.4 Optimierung der Extraktionsmethode

Die besten Ergebnisse hinsichtlich Massenzahl, relativer Standardabweichung und Signal-zu-Rausch-Verhältnissen konnten mit einer Probeneinwaage von 20 mg, dreimaligem Waschen (TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol (80 %) und Aceton(80 %)) und einem Volumenverhältnis der Extraktionsmittel von 1:1:1 erreicht werden. Das finale Probenvorbereitungsschema findet sich in folgender Abbildung 39. Die generierten Massenspektren von Oregano (Abbildung 40) wiesen durchschnittlich 120 Massen mit einer RSD von 7,2 % und S/N-Verhältnissen bis zu 87 auf.

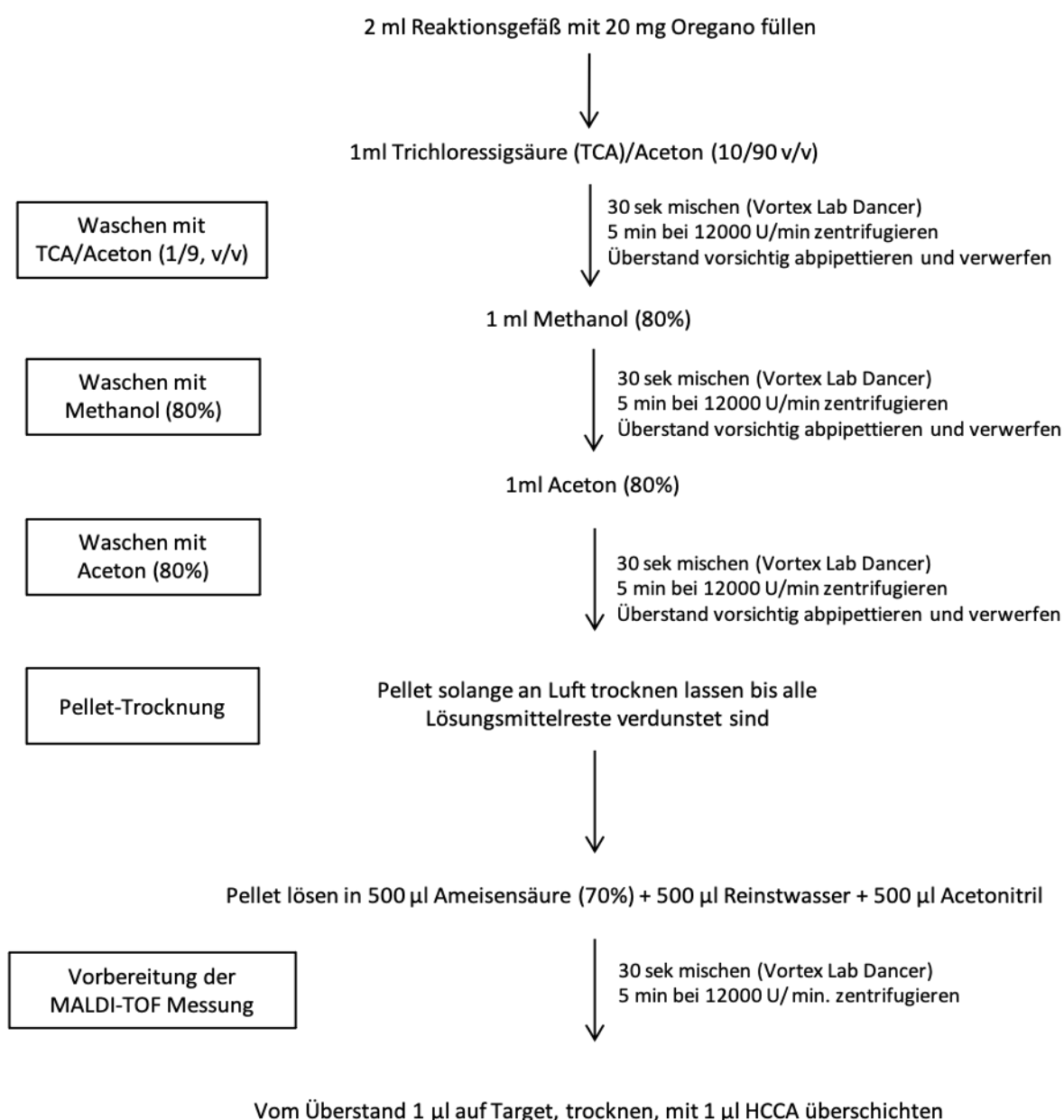


Abbildung 39: Optimiertes Extraktionsschema zur MALDI-TOF-MS Messung von Oregano

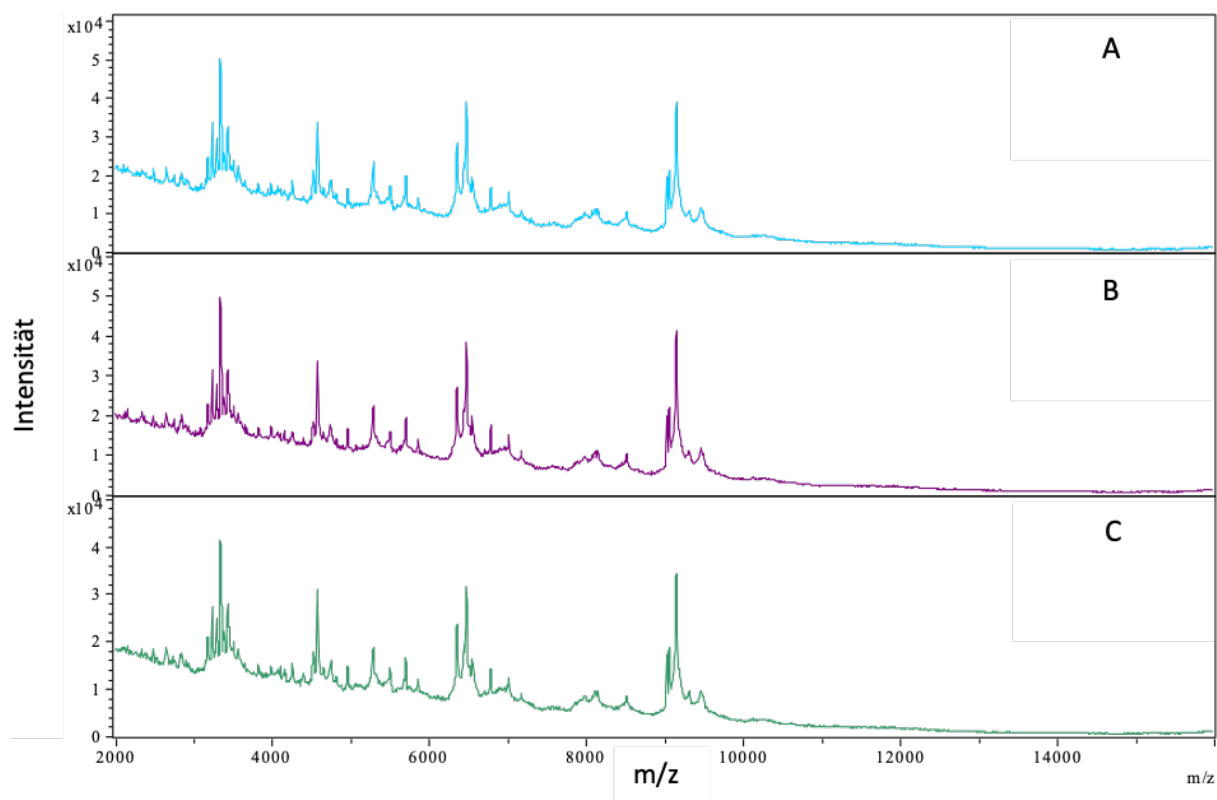


Abbildung 40: MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von Oregano nach Aufarbeitung mittels optimierter Extraktionsmethode (A-C biologische Replikate von drei unterschiedlichen Tagen)

4.2.2 Einflussfaktoren auf das MALDI-TOF MS Spektrum

Einfluss durch Sortenunterschiede

Von allen vier untersuchten Oreganopflanzen (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*, *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*, *Origanum onites* L. und *Lippia origanoides* K.) konnten reproduzierbare Massenspektren generiert werden (vgl. 3.2.4.4). In folgender Pseudo-Gelansicht sind jeweils 9 Massenspektren pro Oreganosorte untereinander abgebildet (Abbildung 41).

Die Massen von *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* und *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* unterschieden sich nur geringfügig in Form von unterschiedlichen Intensitäten, z.B. bei 9200 Da. Stärker abweichend davon waren die Spektren von *Origanum onites*. Diese zeigten insgesamt weniger Massen mit größtenteils niedrigeren Intensitäten. Auch war ein erhöhtes Rauschen im Massenbereich von 2000-4000 kDa zu erkennen, welches sich durch vermehrt homogene Graufärbung in der Gelansicht darstellt. Ebenfalls ein erhöhtes Rauschen in diesem Bereich und noch weniger Massen wiesen die Spektren von *Lippia origanoides* auf. Die zugehörigen Massenspektren sind im Anhang hinterlegt (Abbildung 64).

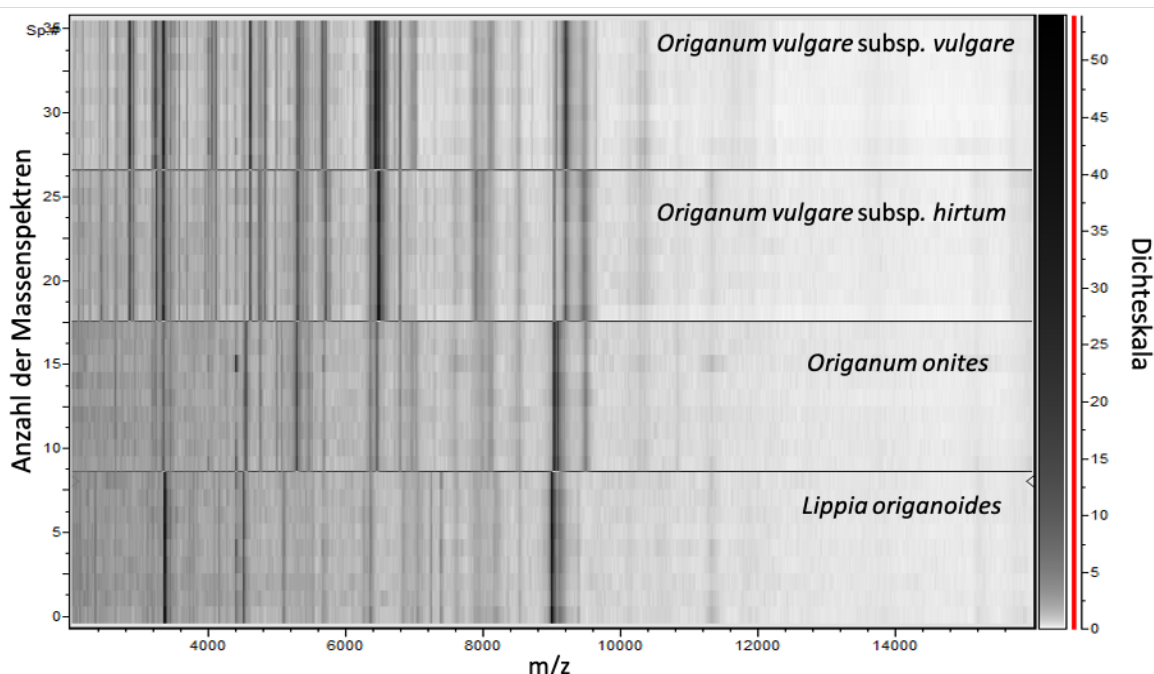


Abbildung 41: Gel-Ansicht der MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) vier verschiedener Oreganopflanzen, je 9 Massenspektren (3 biologische und drei technische Replikate), erstellt mittels der Software Clinpro Tools (Bruker Daltonik)

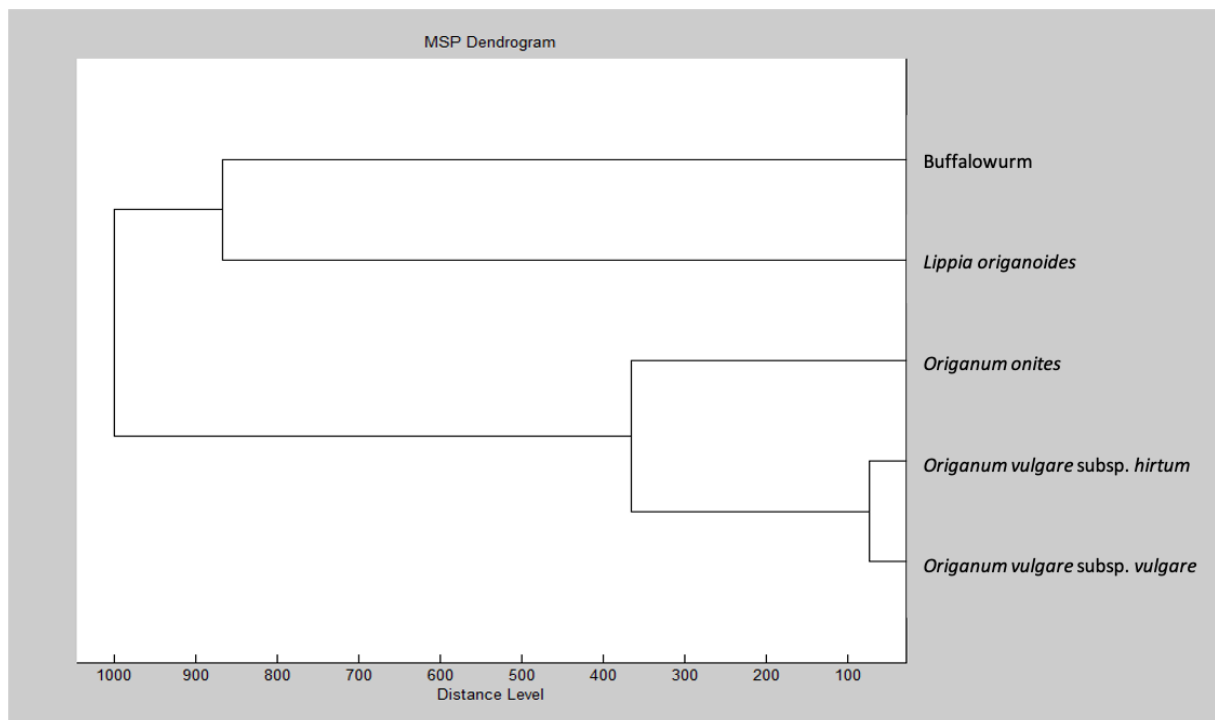


Abbildung 42: Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von verschiedenen Oreganosorten und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte

Im Dendrogramm in Abbildung 42 bildeten die Datensätze der Oreganosorten, bis auf eine Ausnahme, das untere Cluster, das mit einem Distanzlevel von > 950 deutlich von dem oberen Cluster, bestehend aus der externen Kontrollprobe (Buffalowurm) und *Lippia origanoides*, unterschieden werden konnte.

Das untere Cluster ließ sich in zwei Subcluster unterteilen. Das erste bestand aus dem Datensatz von *Origanum onites* (Türkischer Oregano), mit einem Distanzlevel von > 350 zu den restlichen Oregano-Sorten. Die Datensätze von *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* und *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* waren mit einem geringeren Distanzlevel von 50 weniger deutlich voneinander abzugrenzen.

4.2.3 Erstellung von Referenzspektren

Fünf Oreganopflanzen einer Spezies (*Origanum vulgare* subsp. *vulgare*) wurden im Handel erworben (vgl. 3.1.1) und für eine Woche im Trockenschrank getrocknet. Nach Extraktion und Messung mittels MALDI-TOF MS wurden fünf, den Qualitätskriterien entsprechende, Referenzspektren (MSP) erstellt (vgl. 3.2.3) und in der internen Datenbank gespeichert. Jedes erstellte MSP wies nach Abgleich mit den verwendeten Massenspektren Score Values von über 2,6 auf und konnte somit als qualitativ gut bewertet werden. Im hierarchischen Clustering waren diese erwartungsgemäß nicht voneinander abgrenzbar (s. Abbildung 43).

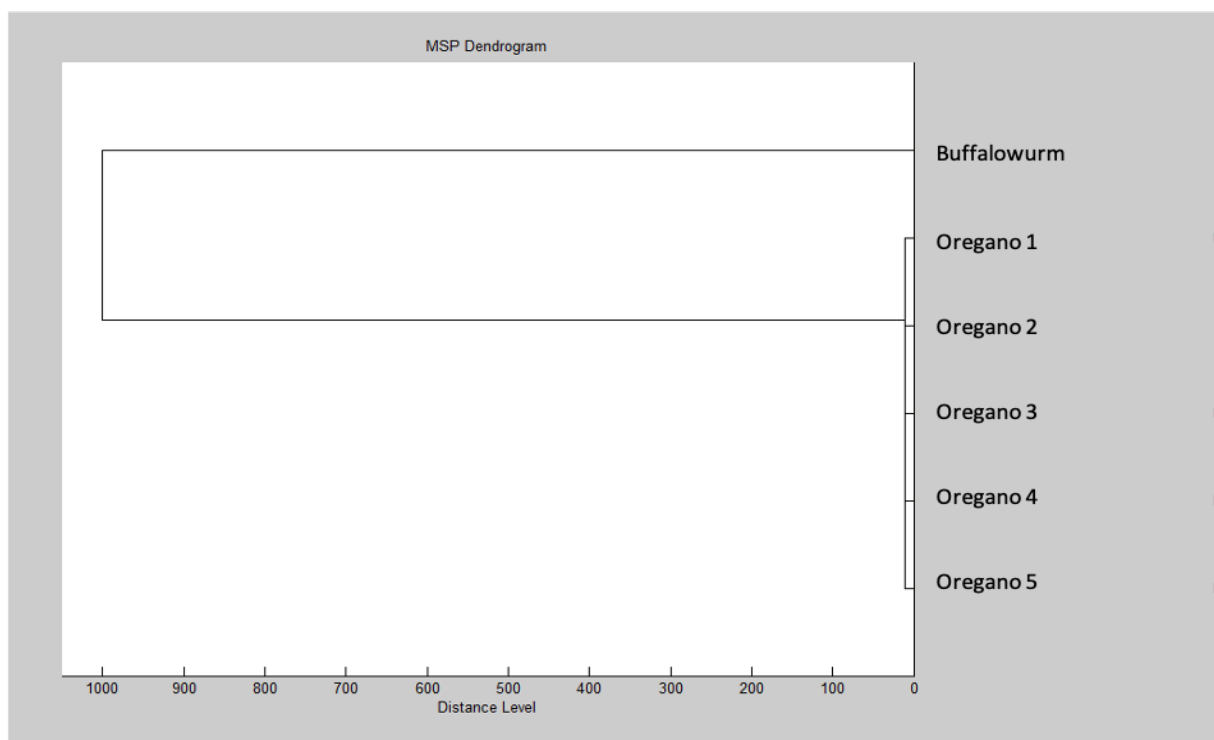


Abbildung 43: Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von fünf Proben *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte

4.2.4 Detektion von Produktverfälschungen

Getrocknete und gemahlene Olivenblätter wurden zu bestimmten Prozentsätzen (vgl. 3.2.5) mit Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *vulgare*) gemischt, nach der optimierten Methode extrahiert und mittels MALDI-TOF MS gemessen. In Abbildung 44 sind jeweils die unterschiedlichen Beimischungsverhältnisse von 95/5 bis 50/50 (w/w) sowie die Reinspektren von Oregano und Olivenblättern dargestellt.

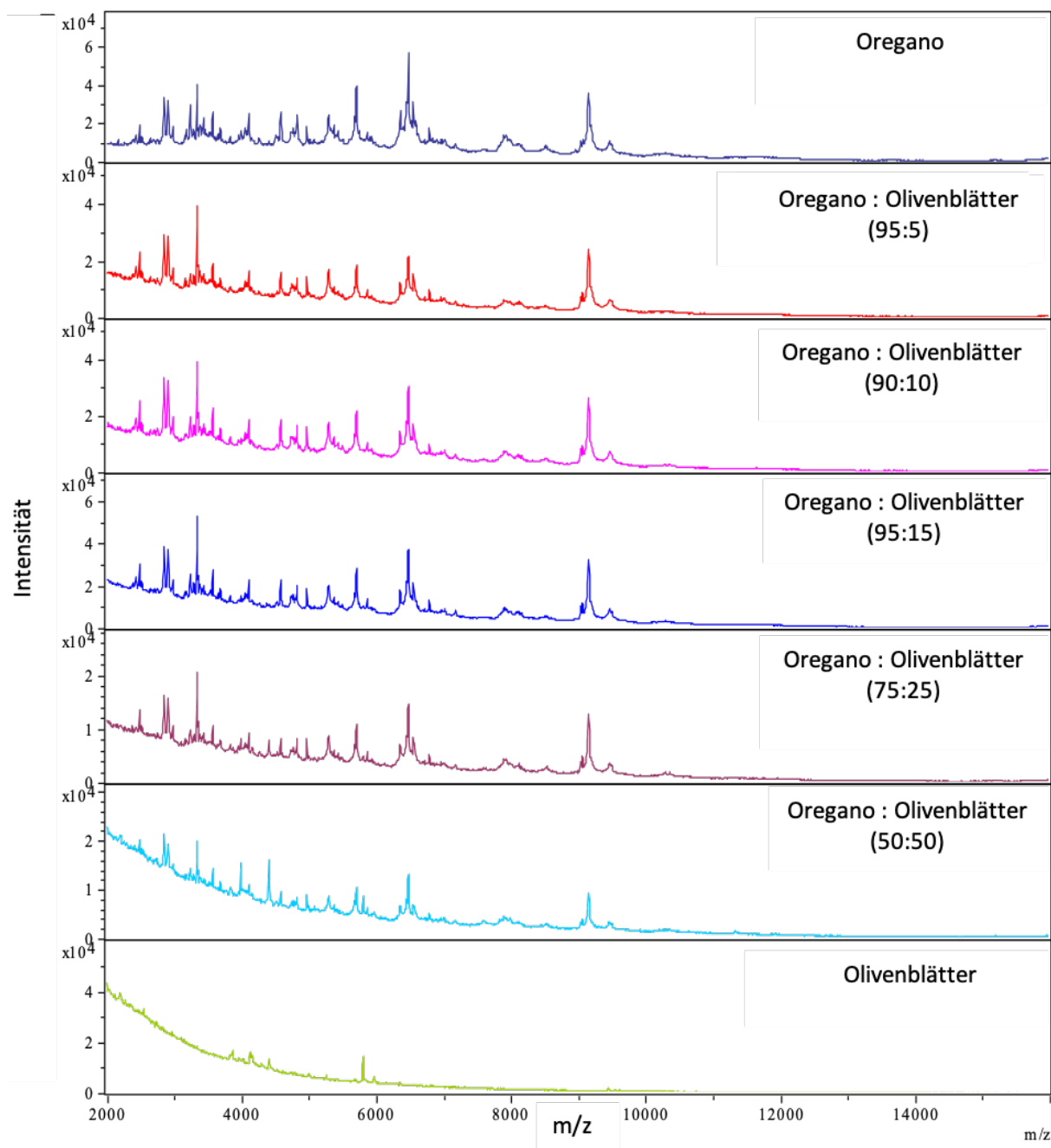


Abbildung 44: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Oregano, artifiziell verfälscht mit Olivenblättern (Verhältnisse in *weight per weight* (w/w))

Die Massenspektren von reinen Olivenblättern wiesen ein sehr hohes Rauschen im niedrigen Massenbereich auf. Zudem konnten ca. 14 Massen mit niedriger Intensität im Bereich von 4000-6000 Da detektiert werden. Die Massenspektren von Oregano zeigten mit steigendem Verfälschungsgrad ebenfalls ein erhöhtes Rauschen. Zusätzliche Massenpeaks waren bis zu einer Verfälschung mit Olivenblättern von 50 % nicht zu erkennen.

Es wurden von allen Verfälschungsgraden und von reinen Olivenblättern Referenzspektren erstellt und in der internen Datenbank gespeichert. Diese Datensätze wurden in einem Dendrogramm hierarchisch geclustert (Abbildung 45).

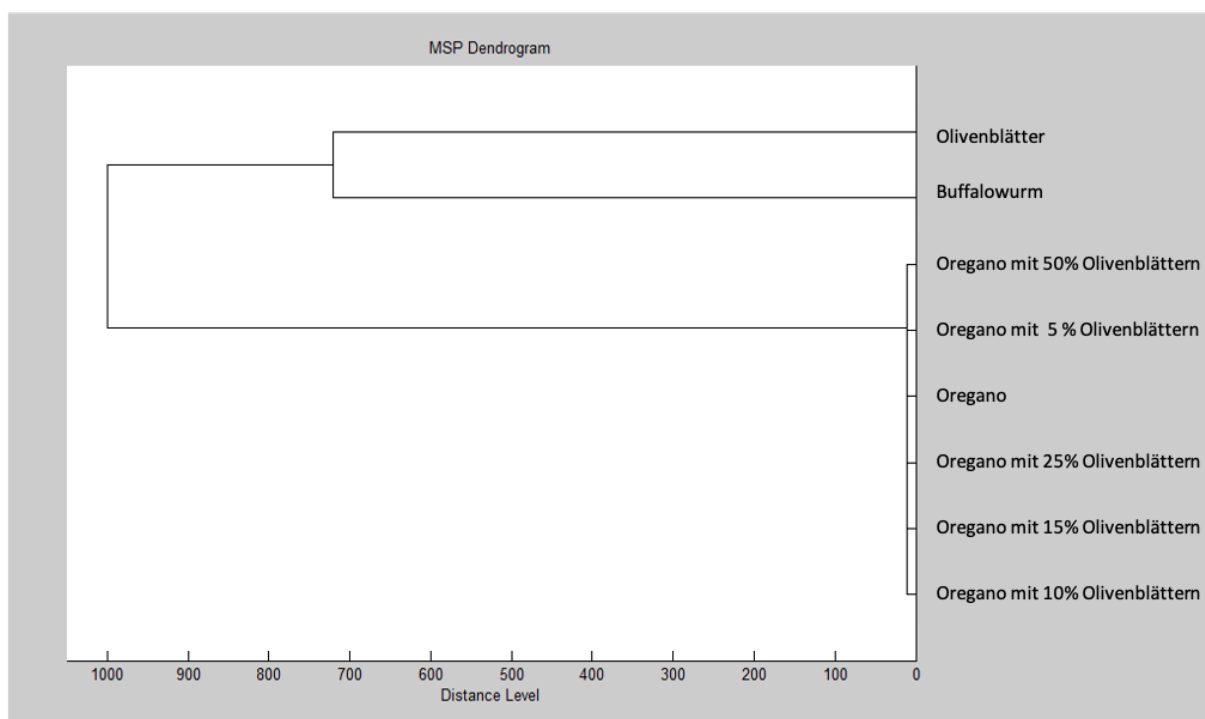


Abbildung 45: Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von Oregano, Olivenblättern und deren Mischungen und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte

Das untere Cluster mit den Datensätzen von Oregano und allen Mischungen von Oregano und Olivenblättern konnte eindeutig (Distanzlevel > 950) von dem oberen Cluster, bestehend aus der externen Kontrollprobe und Olivenblättern, abgegrenzt werden.

Jedoch war eine Unterscheidung der Datensätze von Oregano und der verschiedenen Verfälschungen mit Olivenblättern mit Distanzleveln < 10 nicht möglich.

4.2.5 Messung von Realproben

Von neun Oregano-Gewürzproben aus dem Handel (vgl. 3.1.1) wurden Massenspektren erstellt und mit den gespeicherten Referenzspektren abgeglichen. Die Spektren sind in folgenden Abbildungen 46-48 dargestellt. Die nach Abgleich erhaltenen Score Values wurden gemittelt und zusammen mit dem zugehörigen MSP ebenfalls in folgenden Abbildungen aufgelistet. Ein Score Value von $< 1,7$ indiziert eine unsichere Identifikation, weswegen in solchen Fällen kein verlässliches MSP aus dem Referenzspektrenabgleich angegeben wurde.

Bei nur zwei Proben konnten Score Values über 1,7 erreicht werden. Eine Oreganoprobe aus Deutschland konnte dem MSP von *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* mit einem Score Value von 1,88 zugeordnet werden (Probe 1). Eine weitere Oreganoprobe aus Griechenland (Probe 5) erzielte nach Abgleich einen Score Value von 1,85 mit dem MSP von *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*.

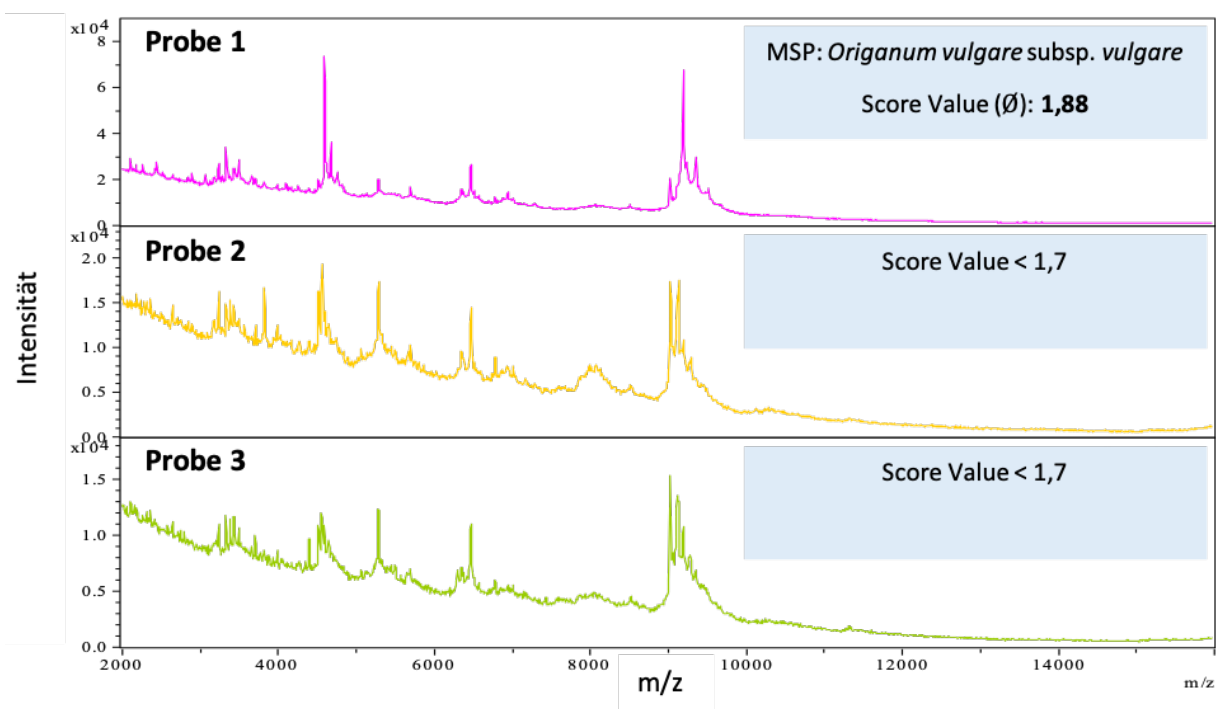


Abbildung 46: MALDI-TOF MS Spektren der Oreganoproben Nr. 1-3, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (Ø aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$)

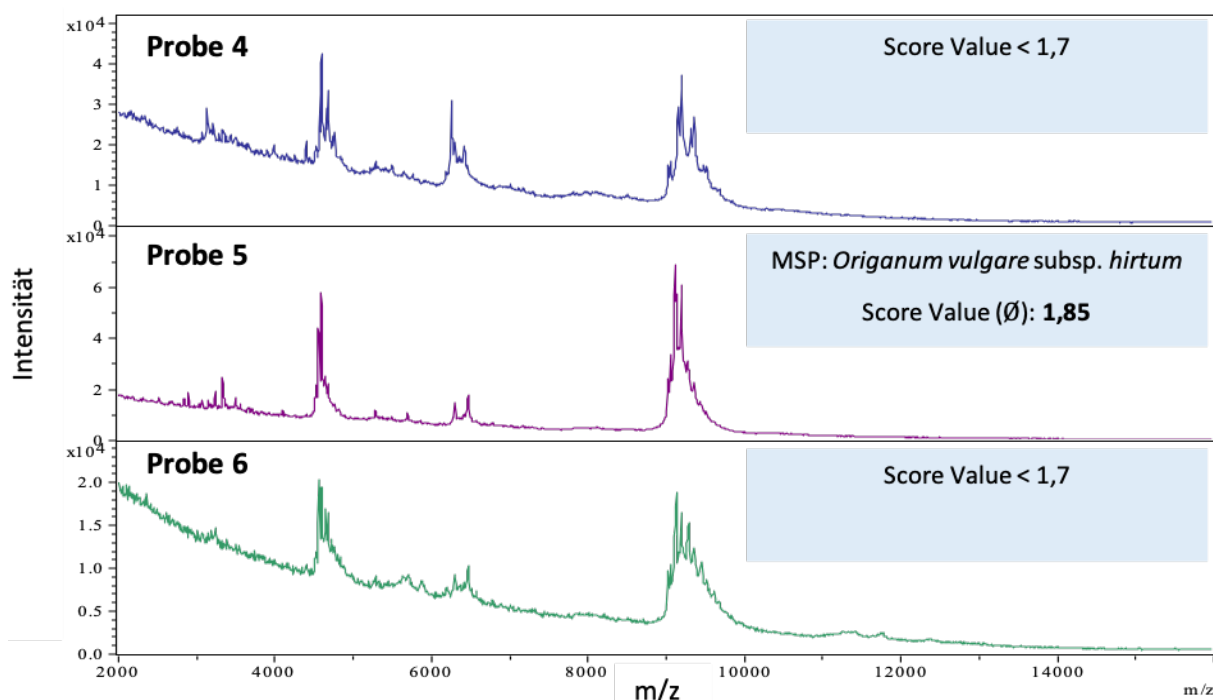


Abbildung 47: MALDI-TOF MS Spektren der Oreganoproben Nr. 4-6, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$)

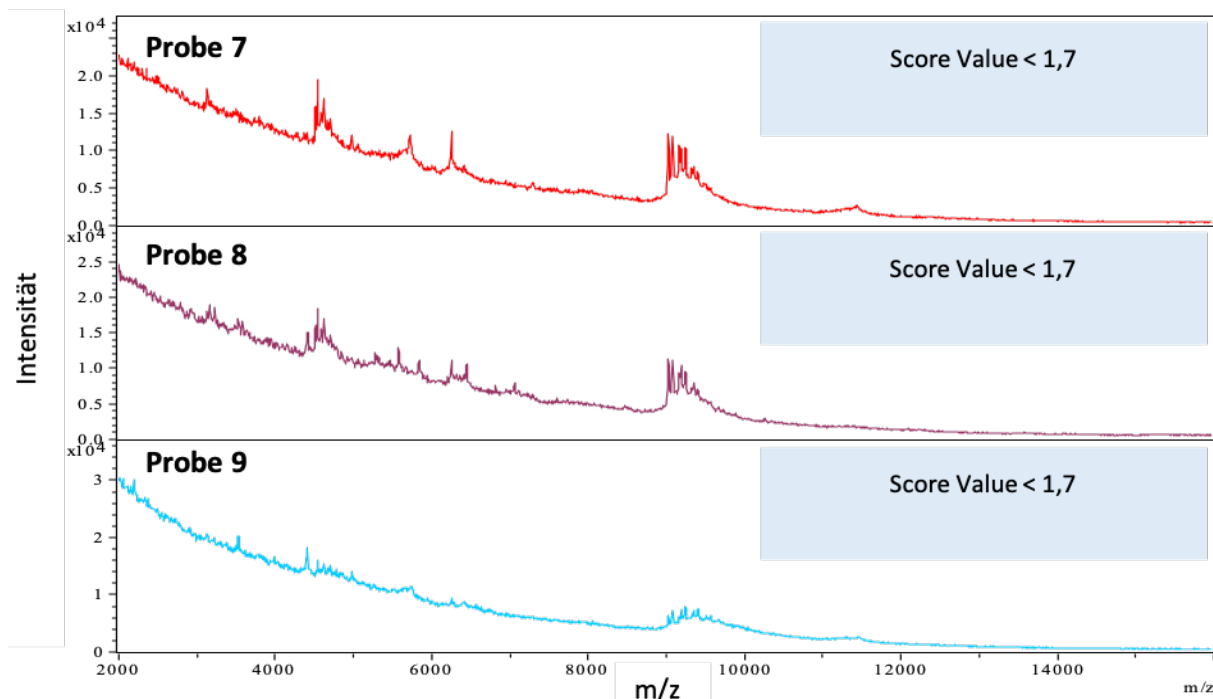


Abbildung 48: MALDI-TOF MS Spektren der Oreganoproben Nr. 7-9, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$)

4.3 Pfeffer

4.3.1 Entwicklung und Optimierung der Extraktionsmethode

Die Extraktion von gemahlenem schwarzem Pfeffer mittels der Methode A (vgl. 3.2.1) und die anschließende Messung mittels MALDI-TOF MS lieferte Massenspektren mit durchschnittlich 35 Massen (Abbildung 49). Die relative Standardabweichung lag bei 25 % und die S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks ergaben Werte zwischen 11 und 99.

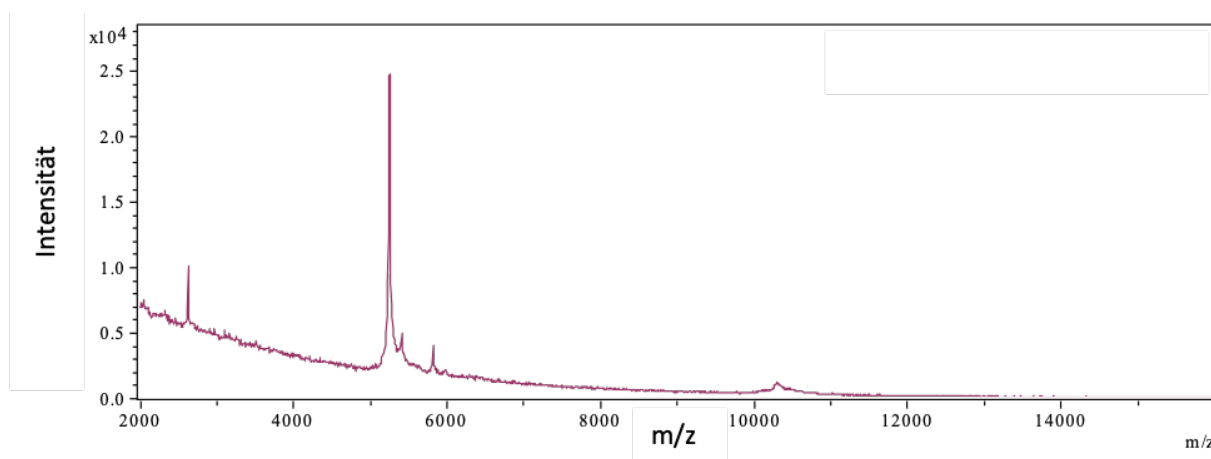


Abbildung 49: MALDI TOF MS Spektrum von schwarzem Pfeffer, aufgearbeitet nach der Methode A (vgl. 3.2.1)

4.3.1.1 Waschen des Pfeffers mit verschiedenen Waschlösungen

Wie bei Paprika und Oregano führte auch das Waschen des Pfeffers vor der Extraktion zu einer erhöhten Massenausbeute. Die Signal-zu-Rausch Verhältnisse konnten bei allen verwendeten Kombinationen um mehr als das Doppelte erhöht werden. Die relative Standardabweichung der Massen lag jedoch allein beim zweimaligen Waschen des Pfeffers mit DMSO/Aceton (1/9, v/v) und DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v) unter 10 % (s. Tabelle 35).

Tabelle 35: Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Pfeffer nach ein- bis dreimaligem Waschen mit verschiedenen Lösungsmittelkombinationen**Einmaliges Waschen:**

Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten
DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v)	44	26	32-207
DMSO/Aceton (1/9, v/v)	66	17	15-209
TCA/Aceton (1/9, v/v)	55	23	21-201

Zweimaliges Waschen:

1. Waschlösung	2. Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten
DMSO/Aceton (1/9, v/v)	DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v)	61	8,1	31-326
DMSO/Aceton (1/9, v/v)	TCA/Aceton (1/9, v/v)	65	25	44-314

Dreimaliges Waschen:

1. Waschlösung	2. Waschlösung	3. Waschlösung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten
DMSO/Aceton (1/9, v/v)	DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v)	TCA/Aceton (1/9, v/v)	50	23	44-260
DMSO/Aceton (1/9, v/v)	DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v)	Methanol	70	25	37-313

4.3.1.2 Mechanische Methoden zum Zellaufschluss

Ein verbesserter Zellaufschluss von Pfeffer wurde anhand drei verschiedener mechanischer Methoden überprüft. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 36-38 dargestellt. Die Anzahl der Massenpeaks und die Signal-zu-Rauschverhältnisse konnten im Vergleich zur Methode ohne zusätzlichen Homogenisierungsschritt (vgl. Tabelle 35) nicht erhöht werden und die RSD lag in jedem Fall über 10 %. Die Homogenisierung von Pfeffer mittels der drei untersuchten Verfahren führte insgesamt nicht zu einer Verbesserung der MALDI-TOF MS Spektren hinsichtlich der Qualitätskriterien.

Tabelle 36: Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Pfeffer nach Behandlung mittels Ultra Turrax

Homogenisierungsverfahren	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
Behandlung mittels Ultra Turrax	57	16	18-278

Tabelle 37: Auswertung der Massenspektren von Pfeffer nach Behandlung mittels Tissue Lyser

Einwaage	Glasbeads	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
20 mg	10	49	22	32-272
20 mg	20	47	27	26-246
50 mg	10	61	16	23-291
50 mg	20	56	13	23-275

Tabelle 38: Auswertung der Massenspektren von Pfeffer nach Behandlung mittels Ultraschallbad

Zeitpunkt der Ultraschallbehandlung	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
Nach Zugabe von DMSO / Aceton (1/9, v/v)	52	23	20-232
Nach Zugabe von DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v)	56	18	20-265
Nach Zugabe der Extraktionsmittel	59	20	20-214

4.3.1.3 Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene Volumenverhältnisse der drei Extraktionsmittel Reinstwasser, Ameisensäure (70 %) und Acetonitril untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 zusammengefasst. Mit einem Verhältnis der Extraktionsmittel von 1:1:1 (Tabelle 39 A) konnten durchschnittlich 60 Massen mit einer RSD von 8,2 % generiert werden. Die Signal-zu-Rauschverhältnisse lagen in einem Bereich von 27-341. Alle folgenden Variationen lieferten Massenspektren mit weniger Massenpeaks verbunden mit einer schlechteren Reproduzierbarkeit (RSDs > 10 %) und S/N-Verhältnisse unter 300. Wie schon bei Paprika und Oregano konnten bei den Versuchen ohne Ameisensäure keine auswertbaren Massenspektren generiert werden.

Tabelle 39: Auswertung der Massenspektren von Pfeffer nach Änderung der Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel

Test	Reinst- wasser [µl]	Acetonitril [µl]	Ameisensäure (70 %) [µl]	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
A	500	500	500	60	8,2	27-341
B	–	1000	500	48	19	21-255
C	250	750	500	51	19	20-272
D	750	250	500	55	31	26-276
E	1000	–	500	60	13	26-296
F	–	500	1000	61	19	26-291
G	250	500	750	51	15	21-241
H	750	500	250	50	23	22– 244
I	1000	500	–	–	–	
J	500	–	1000	52	12	23-248
K	500	250	750	49	17	22-241
L	500	750	250	48	20	22-244
M	500	1000	–	–	–	–

4.3.1.4 Variation der Probeneinwaage

Eine Einwaage von 20 mg führte hinsichtlich der Qualitätskriterien zu den besten Ergebnissen. Versuchsansätze mit anderen Einwaagen resultierten in weniger Massen mit RSDs > 10 % und niedrigeren S/N-Verhältnissen (s. Tabelle 40).

Tabelle 40: Auswertung der Massenspektren von Pfeffer nach Variation der Probeneinwaage

Probeneinwaage [mg]	Massen [Ø]	RSD [%]	S/N-Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks
10	36	22	22-199
20	58	8,4	32-321
50	45	24	26-262
100	29	20	14-195

4.3.1.5 Optimierung der Extraktionsmethode

Die besten Ergebnisse hinsichtlich Massenzahl, relativer Standardabweichung und Signal-zu-Rausch-Verhältnissen konnten mit einer Probeneinwaage von 20 mg, zweimaligem Waschen (DMSO/Aceton (1/9, v/v), DMSO/Reinstwasser (1/9, v/v)) und einem Volumenverhältnis der Extraktionsmittel von 1:1:1 erreicht werden. Das Fließschema findet sich in Abbildung 50. Mittels dieser Methodik wurde ebenfalls weißer Pfeffer extrahiert und gemessen. Die generierten Massenspektren von schwarzem Pfeffer (Abbildung 51) und weißem Pfeffer (Abbildung 52) wiesen durchschnittlich 60 Massen mit einer RSD zwischen 8 und 9 % und S/N-Verhältnissen bis zu 340 auf. Zusätzlich zeigten die Spektren von weißem Pfeffer ein geringeres Rauschen der Grundlinie.

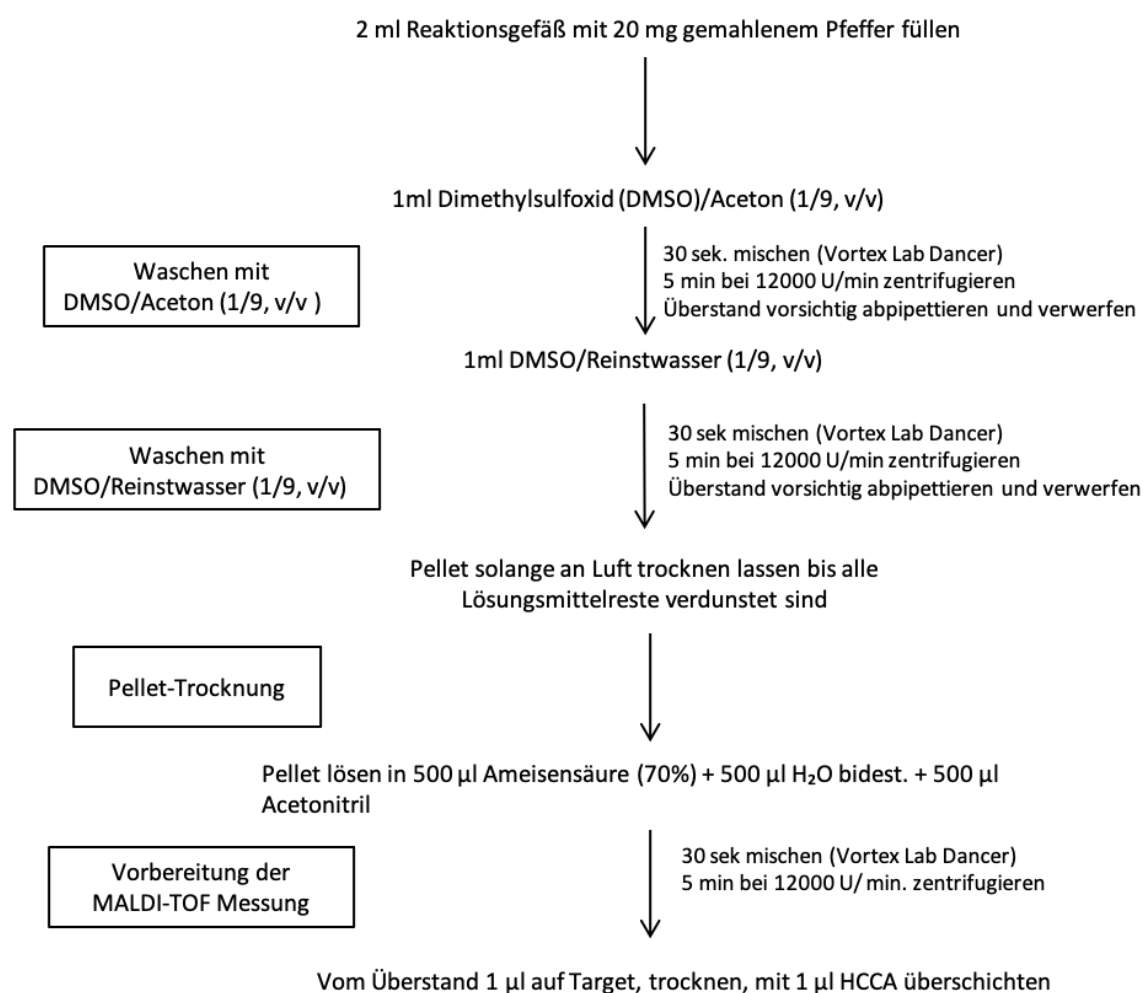


Abbildung 50: Optimiertes Extraktionsschema zur MALDI-TOF-Messung von Pfeffer

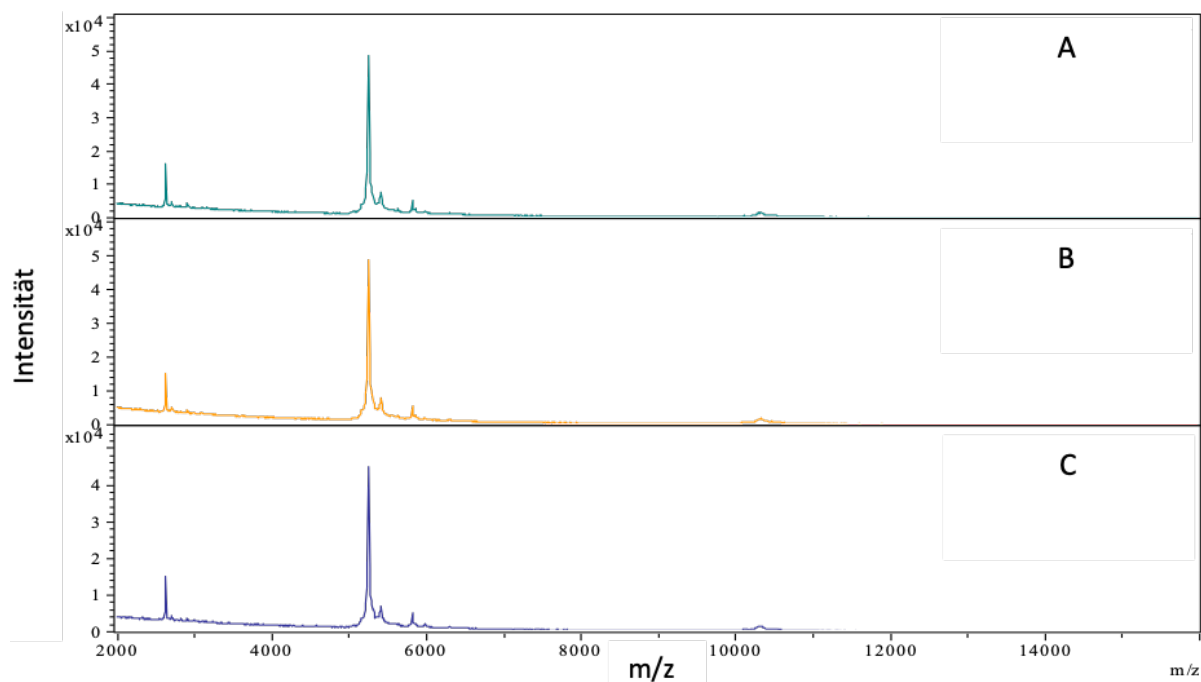


Abbildung 51: MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von schwarzem Pfeffer nach Aufarbeitung mittels optimierter Extraktionsmethode (A-C biologische Replikate von drei unterschiedlichen Tagen)

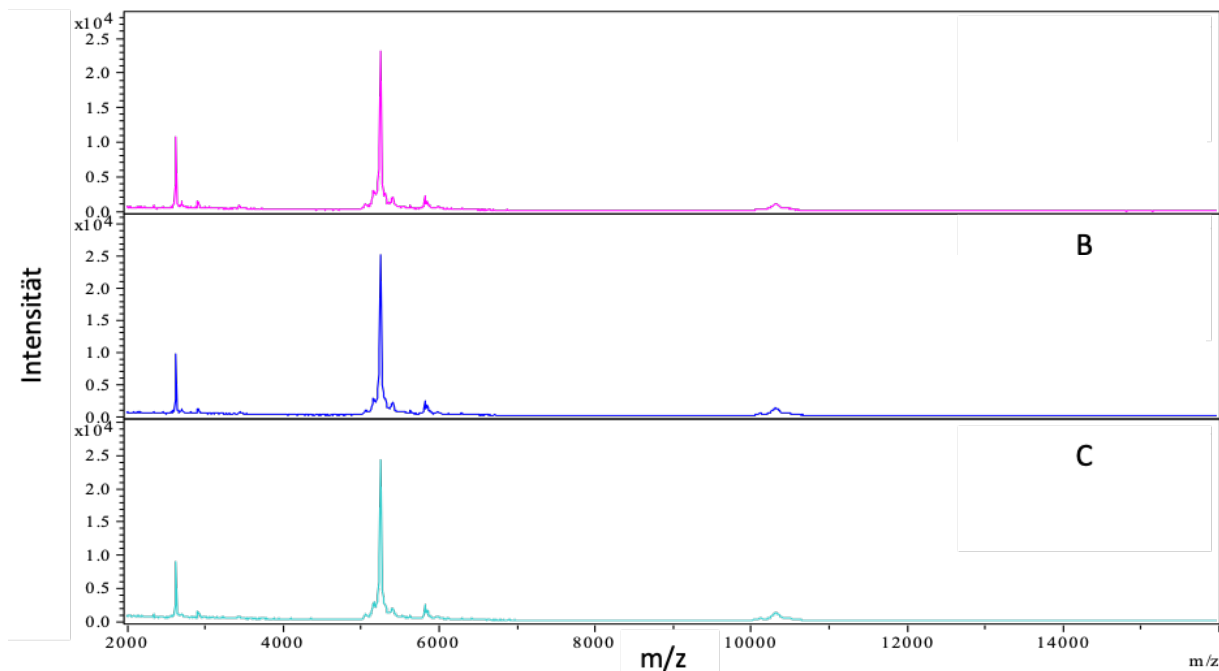


Abbildung 52: MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von weißem Pfeffer nach Aufarbeitung mittels optimierter Extraktionsmethode (A-C biologische Replikate von drei unterschiedlichen Tagen)

4.3.2 Erstellung von Referenzspektren

Von fünf authentischen schwarzen Pfefferproben und einer weißen Pfefferprobe wurden Referenzspektren erstellt (vgl. 3.1.1 und 3.2.3). Jedes erstellte MSP wies nach Abgleich mit den verwendeten Massenspektren Score Values von über 2,5 auf und konnte somit als qualitativ gut bewertet werden. Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle wurden sie in der internen Datenbank gespeichert.

Das aus den Datensätzen dieser MSPs erstellte Dendrogramm zeigte, dass eine Unterscheidung von weißem und schwarzem Pfeffer mittels dieser Methodik nicht möglich war, wobei qualitativ hochwertige, vergleichbare Spektren aus den Referenzproben generiert werden konnten (Abbildung 53). Alle Pfefferproben konnten eindeutig von dem Datensatz der externen Kontrollprobe (Buffalowurm) abgegrenzt werden.

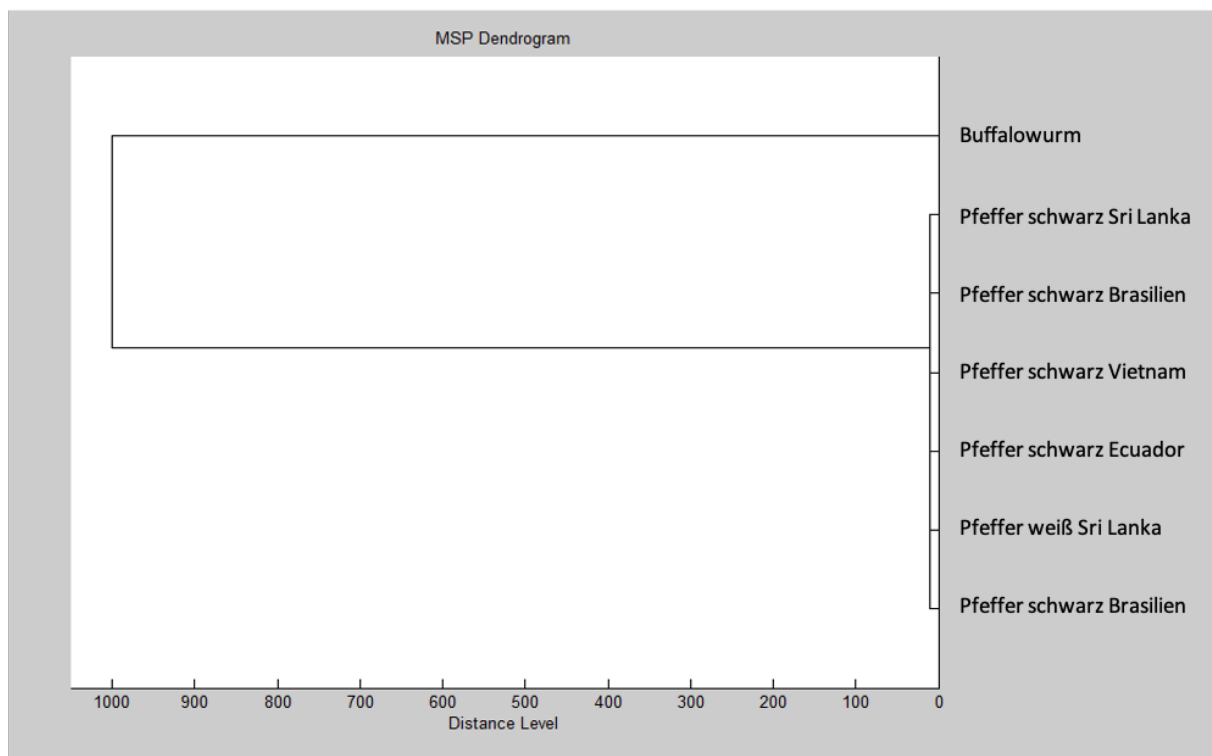


Abbildung 53: Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von fünf verschiedenen schwarzen Pfefferproben, einer weißen Pfefferprobe und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte

4.3.3 Detektion von Produktverfälschungen

Definierte Anteile von gemahlenden Papayasamen wurden zu gemahlenem schwarzem Pfeffer gemischt (vgl. 3.2.5) und nach der entwickelten Extraktionsmethode (vgl. 4.3) aufgearbeitet. In Abbildung 54 sind jeweils die MALDI-TOF MS Spektren der unterschiedlichen Beimischungsverhältnisse von 95/5 bis 50/50 (w/w) sowie die Reinspektren von Papayasamen und schwarzem Pfeffer dargestellt.

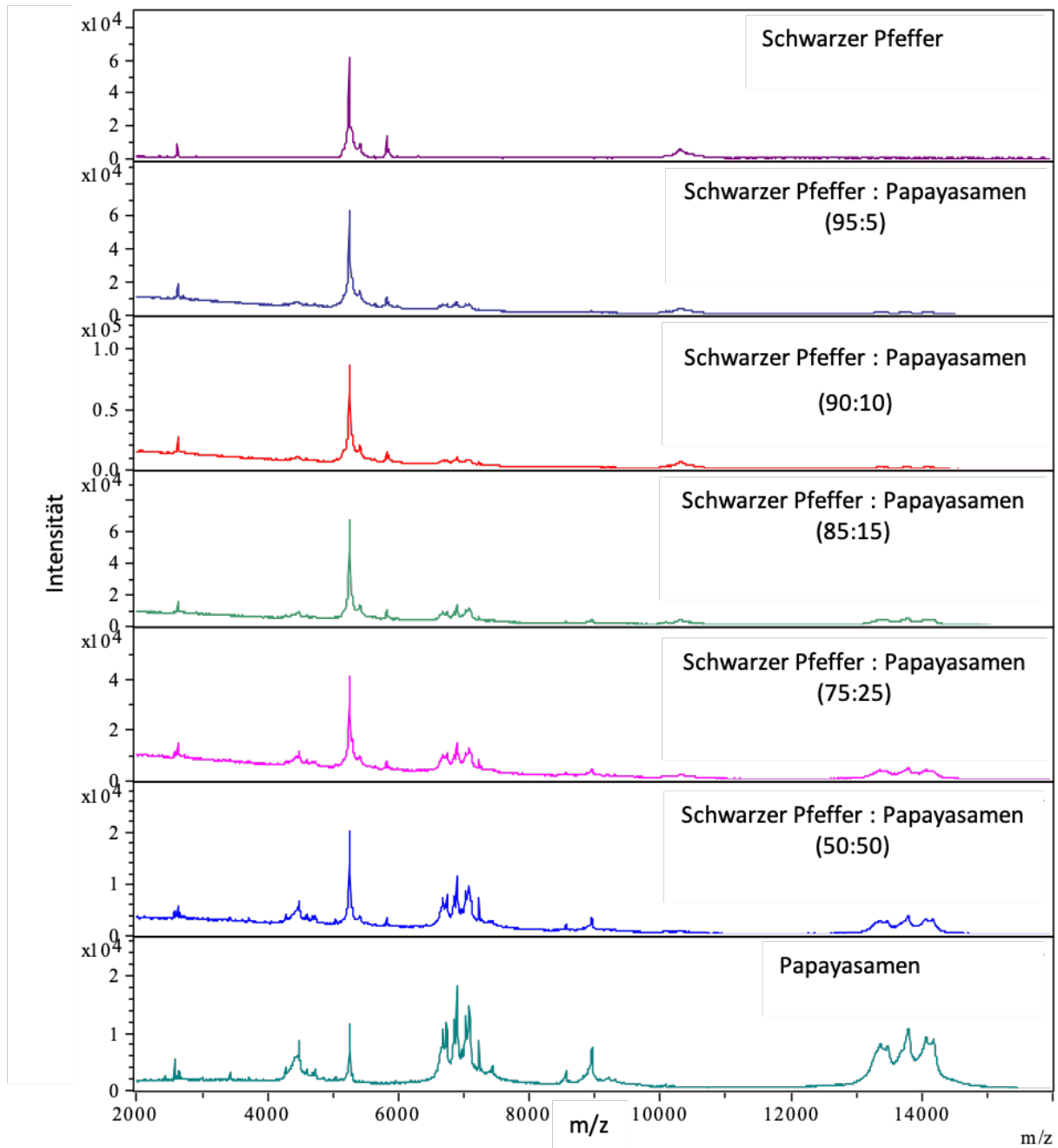


Abbildung 54: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von schwarzem Pfeffer artifizell verfälscht mit Papayasamen (Verhältnisse in *weight per weight* (w/w))

Das Spektrum des reinen schwarzen Pfeffers wies durchschnittlich 75 Massen und das der Papayasamen 170 Massen auf. Wie aus der Abbildung 54 ersichtlich, traten insbesondere zusätzliche Massenpeaks zwischen 6000 und 8000 Da und zwischen 13000 und 15000 Da in den artifiziell verfälschten Spektren auf. Sie waren mit der angewandten Methodik bereits ab einem Anteil von 5 % nachweisbar.

Von jeder Verfälschung (5-50 %) wurden Referenzspektren erstellt und in die interne Datenbank eingelesen. Die Massenspektren aller Verfälschungsgrade wurden anschließend einerseits mit Referenzspektren von authentischem schwarzem Pfeffer (schwarz) und andererseits mit dem MSP des jeweiligen Verfälschungsgrades (grün) abgeglichen. Je größer die Differenz zwischen den beiden erhaltenen Score Values war, desto sicherer war auch die Identifikation bzw. Unterscheidung. Bei einer Verfälschung von 5 % lag die Differenz bei 0,19. Diese nahm mit steigendem Verfälschungsgrad zu und erhöhte sich auf bis zu 0,79 (50 % Verfälschung).

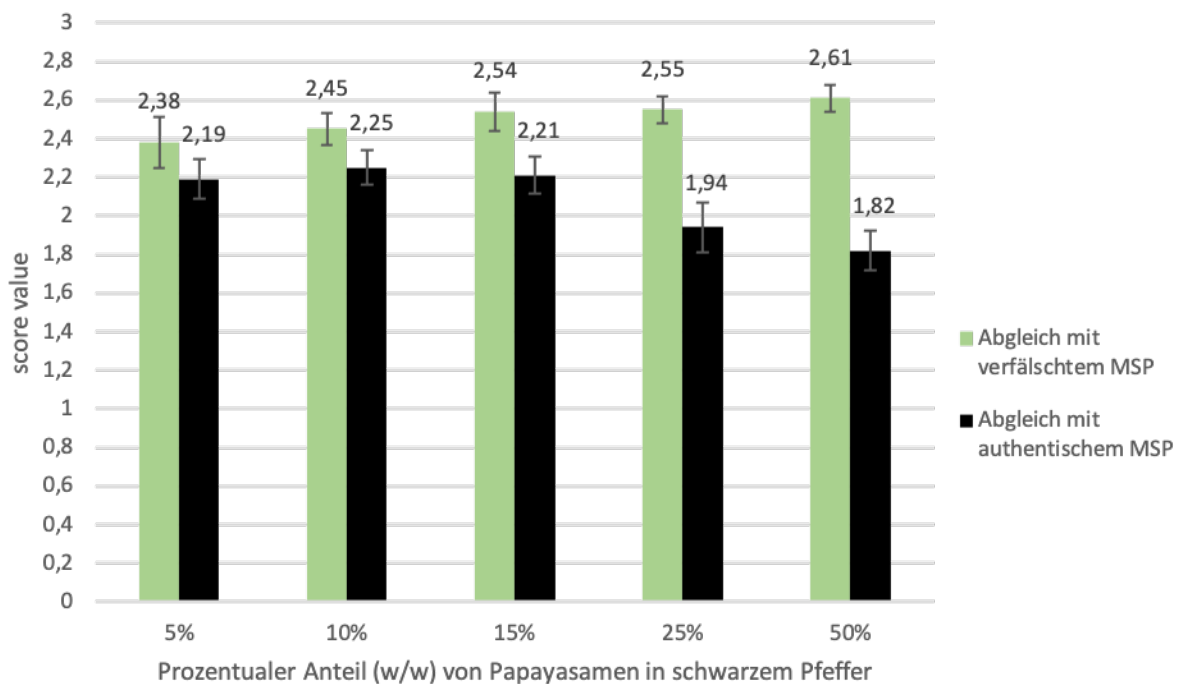


Abbildung 55: Mittlere Score Values von artifiziell verfälschtem schwarzem Pfeffer nach Abgleich mit dem MSP von authentischem schwarzem Pfeffer (schwarz) und mit dem MSP des jeweiligen Verfälschungsgrades (grün); jeweils Mittelwert aus 20 Werten inkl. Standardabweichung; Unterschiede in der Zuordnung zu den MSPs waren für alle Verfälschungen hoch signifikant ($P < 0,01$; Mann-Whitney Rangsummentest)

Die Referenzspektren von Pfeffer, Papayasamen und deren Mischungen wurden mittels eines Dendrogramms in Abbildung 56 verglichen. Die Datensätze von Pfeffer, Papayasamen und Mischungen aus beiden bildeten das untere relevante Cluster, welches mit einem Distanzlevel von > 950 deutlich von dem Cluster der externen Kontrollproben (Buffalowurm) unterschieden werden konnte.

Das untere Cluster konnte in mehrere Subcluster unterteilt werden. Alle Mischungen ließen sich mit Distanzleveln von 30-370 deutlich von den reinen Proben abgrenzen. Je größer der Anteil der Papayasamen in den Mischungen war, desto größer war auch das Distanzlevel zum Datensatz des reinen Pfeffers.

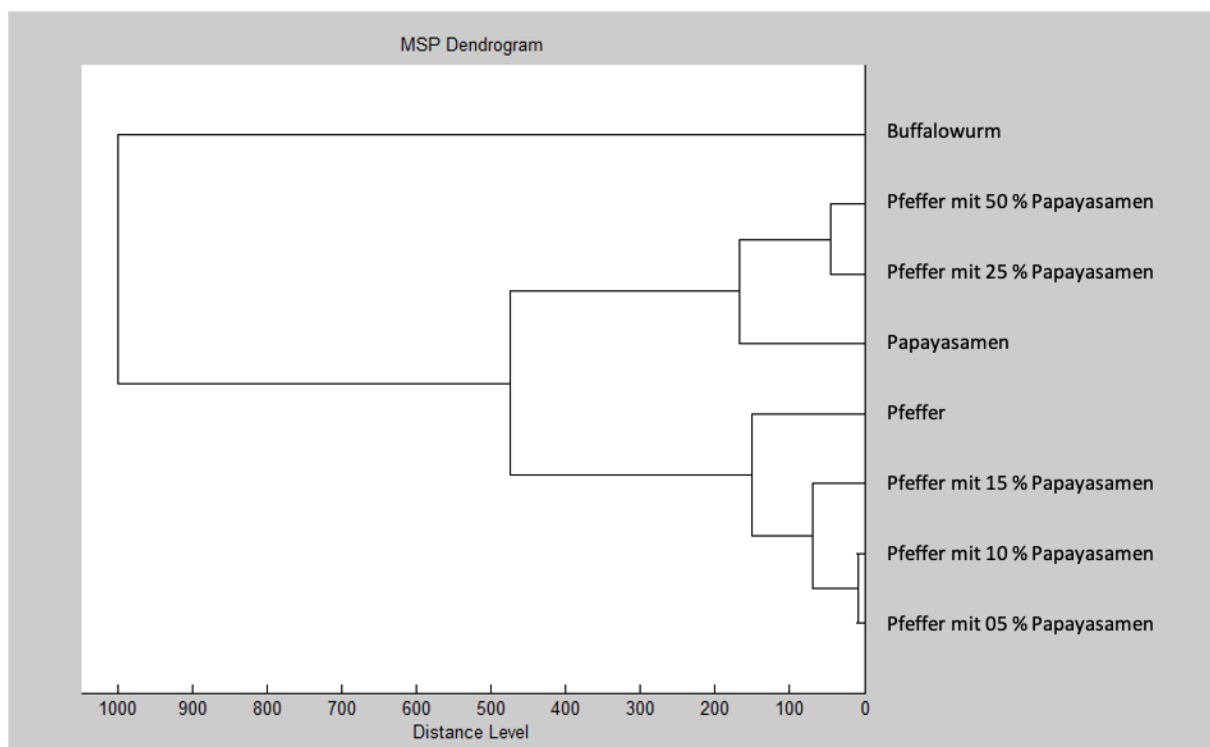


Abbildung 56: Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von schwarzem Pfeffer, Papayasamen und deren Mischungen und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte

4.3.4 Messung von Realproben

Zehn Pfefferproben aus dem Handel (vier weiße und sechs schwarze, vgl. 3.1.1) wurden, wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben, extrahiert, mittels MALDI-TOF MS gemessen und mit den bisher erstellten Referenzspektren abgeglichen. Die Massenspektren sind in folgenden Abbildungen 57 und 58 dargestellt.

Alle weißen Pfefferproben konnten mit Score Values über 2 den Referenzspektren zugeordnet werden, wobei nicht zwischen weißem und schwarzem Pfeffer unterschieden werden konnte. Bei den schwarzen Pfefferproben konnten nur die Proben 8 und 10 nicht eindeutig identifiziert werden. Sie wiesen Score Values unter 1,7 auf. Dabei fielen vor allem ein erhöhtes Rauschen und eine verminderte Signalintensität auf.

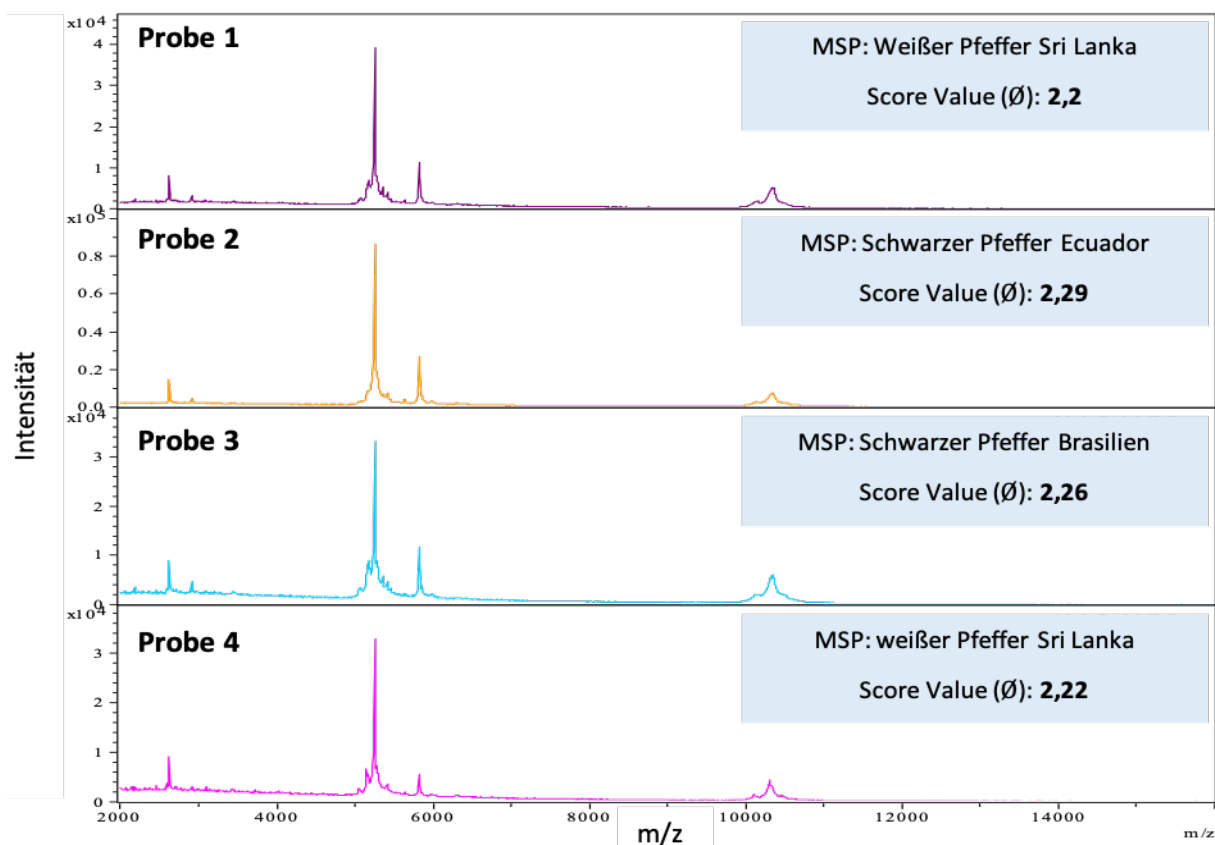


Abbildung 57: MALDI-TOF MS Spektren der weißen Pfefferproben Nr. 1-4, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (Ø aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$)

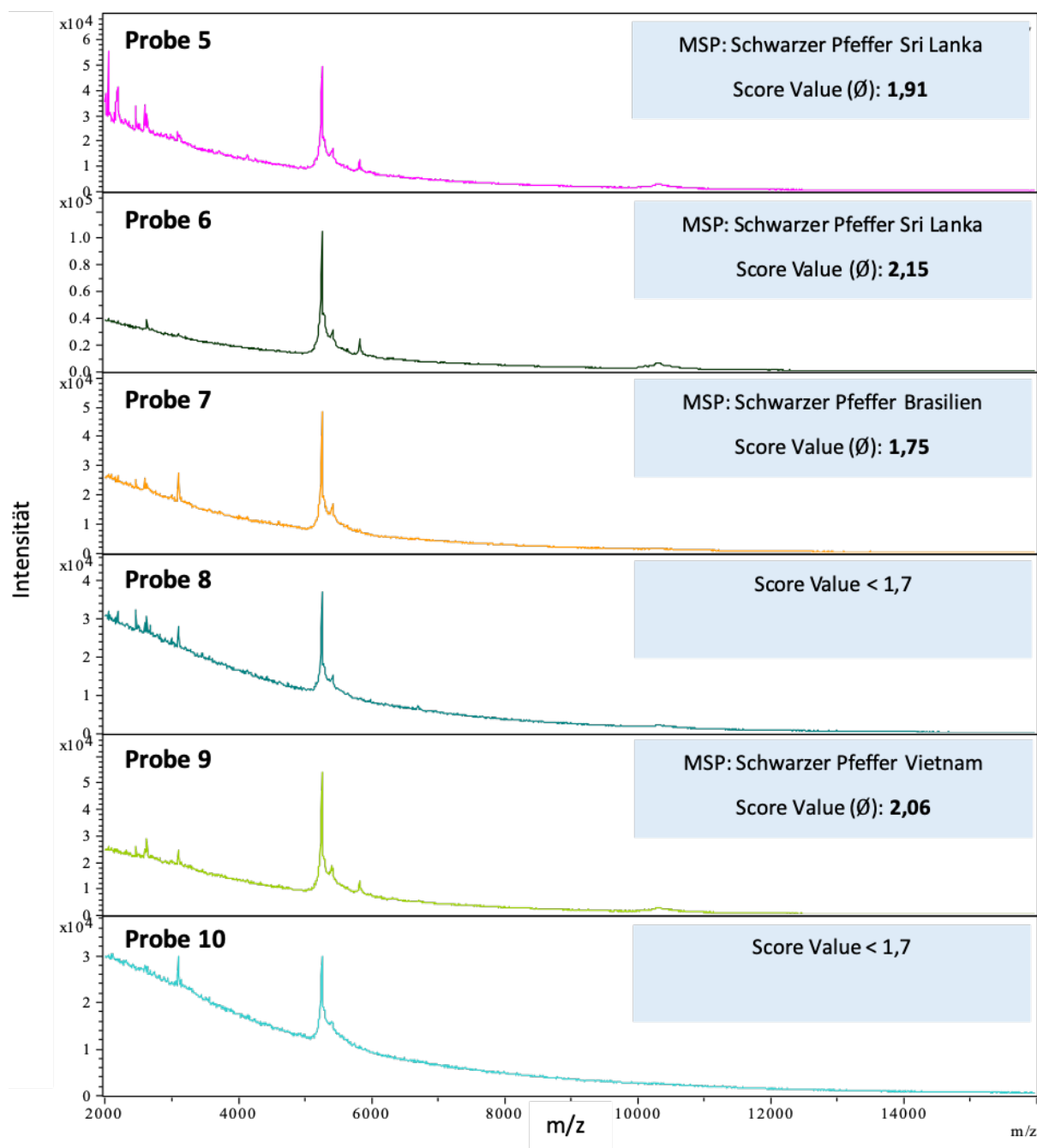


Abbildung 58: MALDI-TOF MS Spektren der schwarzen Pfefferproben Nr. 5-10, rechts: jeweils das MSP mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$)

5 Diskussion

Kräuter und Gewürze gehören aufgrund ihrer weltweiten Herkunft und ihres hohen Preises mit zu den Lebensmitteln, die besonders anfällig für Lebensmittelbetrug sind (Spink et al. 2011, BVL 2017, Hong et al. 2017). Die Entwicklung von Analysemethoden, mit denen die Authentizität schnell und sicher überprüft werden kann, ist deshalb von großer Relevanz für die Bekämpfung von Lebensmittelbetrug (Lohumi et al. 2015).

Die MALDI-TOF Massenspektrometrie ist ein Verfahren, das u.a. in der Routinediagnostik zur Identifikation von Mikroorganismen verwendet wird (Schubert et al. 2011). Dabei werden charakteristische Proteinprofile (Fingerabdrücke) von Reinkulturen generiert und als Referenzspektren gespeichert. Unbekannte Proben können durch Abgleich mit diesen Referenzspektren teils bis zur Subspeziesebene identifiziert werden (Yang 2013). Dieses Prinzip der Fingerprintanalyse (Profiling) mittels MALDI-TOF MS wurde in den letzten Jahren für die Authentizitätskontrolle von beispielsweise Fisch, Milch oder Honig erfolgreich angewandt (Calvano et al. 2012, Bi et al. 2019, Qu et al. 2019).

Studien, in denen pflanzliches Gewebe mittels MALDI-TOF MS Profiling untersucht wurden, befassten sich größtenteils mit der Analyse von Metaboliten, also niedermolekularen Substanzen im niedrigen Massenbereich (Fraser et al. 2007, Mehta et al. 2015). Dahingegen gibt es bis heute kaum Arbeiten, welche auf eine Profiling-Analyse von pflanzlichen Proteinen und anderen höhermolekularen Verbindungen mittels MALDI-TOF MS zur Authentizitätsbestimmung abzielten (Ernst et al. 2015, Mehta et al. 2015).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Anwendbarkeit der MALDI-TOF MS zur Authentizitätskontrolle ausgewählter Kräuter und Gewürze zu prüfen.

5.1 Probenvorbereitung und Extraktion für die MALDI-TOF MS Messung

Bei allen drei Gewürzmatrices lag der Schwerpunkt zunächst auf der Entwicklung einer optimalen Probenvorbereitung und Extraktionsmethode zur Generierung reproduzierbarer und charakteristischer Massenspektren im Bereich von 2-16 kDa. Dazu wurden Waschschrte mit unterschiedlichen Lösungsmitteln, verschiedene Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel und unterschiedliche Probeneinwaagen experimentell geprüft. Bei Pfeffer wurden zusätzlich mechanische Methoden zum besseren Zellaufschluss angewandt.

Die Qualität der generierten Spektren wurde mittels der Software Flex Analysis anhand der Parameter Massenzahl, relativer Standardabweichung (RSD) der Massenzahl und Signal-zu-Rausch (S/N) Verhältnisse der fünf intensivsten Peaks beurteilt. Diese Variablen wurden bereits in vergangenen Studien als Qualitätskriterien für die Beurteilung von MALDI-TOF MS Spektren eingesetzt (Williams et al. 2003, Wetzels et al. 2006, Drevinek et al. 2012). Die Zahl charakteristischer Massen und die S/N-Verhältnisse sollten dabei möglichst hoch und die RSD der Massen (aus Mehrfachmessung mit drei biologischen und je drei technischen Replikaten) unter 10 % sein, um eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen zu ermöglichen. Um die Authentizität der Proben zu gewährleisten, wurden gefriergetrocknete Spitzpaprika, luftgetrocknete Oreganoblätter von einer im Handel erworbenen Pflanze und ganze schwarze Pfefferkörner verwendet.

Das Waschen der Proben führte bei allen drei Gewürzmatrices zu einer deutlichen Verbesserung der Massenspektren hinsichtlich der oben genannten Qualitätsparameter. Bereits das einmalige Waschen der Paprika mit Trichloressigsäure (TCA)/Aceton (1/9, v/v) erhöhte die Massenzahl um 42 % und senkte die RSD auf 8 % (vgl. 4.1.1.1). Auch bei Oregano war diese Wirkung zu beobachten. Während ohne vorherigen Waschschriff nur ein hohes Rauschen, aber keine Massen detektiert wurden, konnte durch einmaliges Waschen mit TCA/Aceton (1/9, v/v) eine Massenzahl von 63 mit einer RSD von 18 % erreicht werden (vgl. 4.2.1.1). Zwei zusätzliche Waschschriffe bewirkten eine weitere Erhöhung der Massen und eine Senkung der RSD auf unter 10 %. Mehr als drei Waschschriffe wurden nicht durchgeführt, um einen Verlust spezifischer Moleküle zu verhindern.

In mehreren Studien zur Proteinextraktion von Pflanzenmaterial und Analyse mittels Gelelektrophorese konnte ebenfalls eine Verbesserung der Resultate durch Waschen der Proben beobachtet werden (Islam et al. 2004, Isaacson et al. 2006, Wang et al. 2006). Dabei verwendete Lösungsmittel waren TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol (80 %) und Aceton (80 %). Interferierende Substanzen wie Pigmente und andere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe konnten so abgetrennt und die Proteinausbeute und -qualität deutlich gesteigert werden. Auch die MALDI-TOF MS Messung kann durch niedermolekulare Substanzen wie Pigmente oder hohe Salzkonzentrationen beeinflusst werden (Buskirk et al. 2011, Hu et al. 2015). Diese können zu einer Suppression der Ionisationsenergie führen, was eine Intensitätsminderung der anderen Signale zur Folge hat (Duncan et al. 2008).

Bei schwarzem Pfeffer führte das zweimalige Waschen der Proben mit Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kombination mit Aceton bzw. Reinstwasser zu den besten Ergebnissen hinsichtlich der Qualitätskriterien (vgl. 4.3.1.1). Es ist bekannt, dass schwarze Pigmente in den Sporen von Schimmelpilzen (*Aspergillus niger*, *Stachybotrys* spp.) die Messung mittels MALDI-TOF MS stören und zu nicht reproduzierbaren Massenspektren führen können (Buskirk et al. 2011). Studien dazu zeigten, dass ein Waschen des Myzels mit DMSO zu einer deutlichen Qualitätssteigerung der Massenspektren führte (Ulrich et al. 2016).

In einem weiteren Schritt wurde das ideale Volumenverhältnis der Extraktionsmittel Acetonitril, Ameisensäure (70 %) und Reinstwasser evaluiert. Mit einem Verhältnis von 1:1:1 waren die besten Ergebnisse zu verzeichnen (vgl. 4.1.1.3, 4.2.1.2 und 4.3.1.3). In einer Reihe von Studien zur Proteinextraktion für die MALDI-TOF MS Messung von Bakterien, Hefen oder Schimmelpilzen wird ebenfalls Ameisensäure (70 %) und Acetonitril verwendet (Bizzini et al. 2010, Cassagne et al. 2013, Paul et al. 2017). Ameisensäure führt demnach zum Zellaufschluss, wodurch nachfolgend Proteine extrahiert und in Acetonitril gelöst werden können (Matsuda et al. 2012, Nguyen et al. 2019). Dieser Zellaufschluss durch Ameisensäure war auch in dieser Arbeit ein entscheidender Schritt. So konnten in den Ansätzen, in denen nur Acetonitril und Reinstwasser verwendet wurden, keine auswertbaren Massenspektren generiert werden.

Der Zellaufschluss und die daraus folgende bessere Verfügbarkeit von spezifischen zellulären Bestandteilen, wie beispielsweise ribosomalen Proteinen, stellt einen wichtigen Schritt in der Entwicklung einer Extraktionsmethode für die MALDI-TOF MS Messung dar. Im Gegensatz zu Tieren und Bakterien besitzen viele Pflanzen sehr widerstandsfähige Zellwände um Umweltbelastungen standhalten zu können (Fíla et al. 2011). Ein häufiger Bestandteil dieser ist das phenolische Makromolekül Lignin. Durch Ausbildung einer Verbundstruktur mit Cellulosen und Hemicellulosen, vor allem nach der abgeschlossenen Zellreifung, kommt es zur Verholzung (Behr et al. 2017). Diese kann u.a. die Proteinextraktion stark erschweren, wie bereits Fíla et al. (2011) in ihrer Arbeit deutlich machten. Sie zeigten auf, dass robuste Homogenisierungsverfahren wie ein Tissue Lyser notwendig waren, um die Zellwände von getrockneten Tabakpollen aufzuschließen und die Proteine extrahieren zu können.

Die Zellwände der getrockneten Pfefferkörner besitzen ebenfalls eine dicke und lignifizierte Struktur (Rezvanian et al. 2016). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob neben dem Mahlen zusätzliche Homogenisierungsverfahren zu einer qualitativen Verbesserung der Massenspektren führen. Schwarzer Pfeffer wurde mittels weiterer mechanischer

Zerkleinerungsverfahren (UltraTurrax-Mixer, TissueLyser) oder im Ultraschallbad behandelt. Für die Messung mittels MALDI-TOF MS führte keines der genannten Verfahren zu einer Qualitätsverbesserung der Massenspektren (vgl. 4.3.1.2). Begründet könnte dies dadurch sein, dass in dieser Arbeit, im Gegensatz zu oben genannter Studie, zusätzlich Ameisensäure (70 %) zum Zellaufschluss verwendet wurde (Fíla et al. 2011). Dieses Extraktionsmittel könnte, verbunden mit dem vorangegangenen Mahlen, ausgereicht haben, um die Zellwände der Pfefferkörner soweit aufzuschließen, dass genug Zellbestandteile gelöst werden konnten.

Für alle drei Testmatrices wurde die optimale Probenmenge für eine qualitativ hochwertige Messung ermittelt. In der Literatur sind für pflanzliche Matrices Probeneinwaagen zwischen 20 bis 300 mg beschrieben (Giavalisco et al. 2003, Wang et al. 2006), wobei für die überprüften drei Gewürze beste Ergebnisse mit einer Einwaage von 20 mg erreicht werden konnten (vgl. 4.1.1.3, 4.2.1.3 und 4.3.1.4). Bei größeren Mengen war ein vermehrtes Rauschen zu verzeichnen, was auf die höhere Anzahl von niedermolekularen interferierenden Substanzen zurückzuführen sein könnte (Duncan et al. 2008).

Der Abgleich von Spektren mit Referenzspektren wurde in den folgenden Untersuchungen mittels der Software Biotyper Compass Explorer 4.1 durchgeführt. Der so erhaltene numerische Wert (Score Value oder $\log(\text{score})$ -Wert) ist ein Maß für die Übereinstimmung der Massenspektren mit den Referenzspektren und bezieht die Zahl der übereinstimmenden Massenpeaks, deren Intensität und Verhältnis zueinander sowie die Massengenauigkeit mit in die Berechnung ein (Rettinger 2013, Yang 2013). Der Höchstwert liegt bei 3. Bei der Identifizierung von Mikroorganismen handelt es sich laut den Herstellerempfehlungen bei Werten zwischen 2 und 3 um eine Identifizierung auf Speziesebene, zwischen 1,7 und 2 auf Gattungsebene und bei unter 1,7 um keine eindeutige Identifikation (Anonymus 2012). Es gibt bisher keine Empfehlungen über die Aussage der Score Values für Gewürzmatrices, so dass erst eine breite Datenbasis generiert werden muss, um die Anwendbarkeit dieses Ansatzes in der Praxis zu prüfen. Daher wurden die Spektren in dieser Arbeit mittels MALDI Biotyper evaluiert, um eine Ab- oder Zunahme der Ähnlichkeit zwischen Massen- und Referenzspektren darstellen und die automatisierte Identifikation anhand dieser Software prüfen zu können. In einer Studie zur Speziesdifferenzierung von Fischen mittels Biotyper Compass Explorer wurde ebenfalls der Score Value als Maß für die Übereinstimmung der Proben untersucht (Spielmann et al. 2018). Jedoch sind auch dort noch weitere Validierungsschritte und eine Vergrößerung der Datenbank nötig, um eine genaue Aussage über die Anwendbarkeit treffen zu können.

5.2 Einflussfaktoren

Gewürze sind keine frischen Materialien und haben meist verschiedene Herstellungs-, Trocknungs- und Lagerungsschritte durchlaufen. Eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern die Massenspektren durch intrinsische Faktoren (unterschiedliche Fruchtbestandteile, verschiedene Sorten) und extrinsische Faktoren (verschiedene Trocknungsverfahren, mikrobielle Kontaminationen) beeinflusst werden.

In Kapitel 4.1.2.1 wurde ein möglicher Einfluss der Trocknung auf die Massenspektren von gefriergetrockneter und in einem Trockenschrank getrockneter Spitzpaprika (excl. Samen) untersucht. Die generierten Spektren wurden mit Referenzspektren von bereits getrocknet erworbener Gewürzpaprika abgeglichen. Während der Score Value der gefriergetrockneten Paprika nur bei ca. 1,0 lag (schlechte Übereinstimmung der Spektren) stieg der Score Value mit steigender Trocknungsdauer an, bis der Wert nach sieben Wochen bei über 2,0 lag (gute Übereinstimmung). Je länger die Paprika demnach über diesen Zeitraum im Trockenschrank getrocknet wurde, desto ähnlicher wurden die Massenspektren dem Referenzspektrum. Es konnte folglich angenommen werden, dass die Gewürzpaprika, mit der das Referenzspektrum erstellt wurde, mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls an der Luft getrocknet wurde.

Insgesamt zeigte diese Untersuchung, dass Trocknungsart und -dauer einen Einfluss auf die Massenspektren von Paprika haben. Für andere Gewürze könnte dies auch gelten, müsste jedoch im einzelnen Fall überprüft werden. Für die Erstellung von Referenzspektren und eine erfolgreiche Identifikation sollte, zumindest bei Paprika, bekannt sein, welches Trocknungsverfahren angewandt wurde. Die Lufttrocknung direkt an der Sonne oder unter kontrollierten Bedingungen ist für alle Kräuter und Gewürze aus Kostengründen am gebräuchlichsten (Belitz et al. 2013, Jin et al. 2017). Die Gefriertrocknung stellt dagegen ein vergleichsweise aufwendigeres, aber auch sehr schonendes Verfahren dar, da unerwünschte Oxidationsprozesse oder Proteindenaturierungen vermieden werden können (Neumann et al. 1955). Dies zeigte sich auch bei der Auswertung der Massenspektren. Bei der über neun Wochen im Trockenschrank getrockneten Paprika fiel ein Unterschied in Form von stärkerem Rauschen und mehr Massen im Vergleich zur gefriergetrockneten Paprika auf (vgl. Abb. 17). Ursächlich dafür könnten durch physikalische und/oder chemische Prozesse bedingte Proteinschädigungen sein, die während der Lufttrocknung ablaufen (Heiss et al. 2002).

Als weiterer möglicher intrinsischer Einflussfaktor auf das Massenspektrum von Paprika wurden Paprikabestandteile (Samen, Fruchtfleisch mit und ohne Exokarp und Scheidewände) einzeln untersucht (vgl. 4.1.2.2). Das Spektrum der Samen unterschied sich deutlich von den Spektren der restlichen Bestandteile. Es wies mehr und abweichende Massenpeaks auf (s. Abbildung 20). Dies wird vermutlich durch einen höheren Proteingehalt der Samen verursacht. El-Adawy et al. (2001) bestimmten den Proteingehalt in Paprikasamen mit ca. 24 g/100 g Trockensubstanz (TS). Im reinen Fruchtfleisch verschiedener Paprikasorten wurden in einer Arbeit von Kim et al. (2019) dagegen nur Proteingehalte um die 13 g/100 g TS gemessen. Allgemein kann jedoch keine genaue Aussage darüber getroffen werden, welcher Art (Proteine, Peptide, Lipide oder andere Zellbestandteile) die gemessenen Signale sind.

Dieser Einfluss der Samen ist technologisch von Bedeutung, da bei der Produktion von Paprika oft unterschiedliche Anteile an Samen mitgemahlen werden (Schormüller 2013). Gesetzliche Vorschriften oder Leitsätze darüber, wie hoch der Samenanteil sein darf oder soll, gibt es nicht. Meist ist er abhängig von der Paprikasorte und dem gewünschten Schärfegrad. Je schärfer das Gewürz sein soll, desto mehr Samen und Scheidewände werden mitvermahlen, da sich vor allem dort der Schärfestoff Capsaicin befindet (Suzuki et al. 1984).

Allein für die Erstellung von Referenzspektren einer Probe müssen somit viele MSPs erstellt werden, um alle Mischungsverhältnisse von Samen und Fruchtfleisch abzudecken und falsch negative Ergebnisse bei der Identifikation zu vermeiden. Jedoch liefert diese Methode auch die Möglichkeit schnell bestimmen zu können ob und wieviel Samen in einer Paprikaprobe mitvermahlen wurden. Dies kann bei internen Qualitätskontrollen zur Überprüfung der Zusammensetzung genutzt werden.

Für Paprika wurde zudem ein möglicher Einfluss mikrobieller Kontaminationen und mikrobiell verursachten Verderbs auf die Massenspektren untersucht (vgl. 4.1.2.3). Dazu wurde Paprika mit *Pectobacterium carotovorum* und *Aspergillus niger* künstlich kontaminiert. Beide führten in der Vergangenheit zum Verderb von Paprikafrüchten bzw. zur Kontamination mit dem gesundheitsgefährdendem Ochratoxin A (Almela et al. 2007, Choi et al. 2013).

Die Negativ-Kontrollen und eine Versuchsprobe zeigten nach der ersten Woche trotz vorheriger Desinfektion der Paprika mit Ethanol (100 %) eine Kontamination mit zwei verschiedenen *Bacillus* spp. Dies ist darauf zurückzuführen, dass *Bacillus*-Sporen, gegen die Ethanol unwirksam ist (Ziegler 1883), auf den Paprika vorhanden waren. Diese Kontamination war jedoch vernachlässigbar, da die Negativ-Kontrollen keine Anzeichen von

Verderbserscheinungen aufwiesen, und auch die Massenspektren keine Abweichungen zeigten.

Die Massenspektren der Versuchsproben zeigten ab Woche 2 deutliche Abweichungen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (vgl. Abb. 26). Die Veränderungen zeigten sich in Form von starken Intensitätseinbußen der Massen um bis zu 50 %, sodass der Score Value nach Abgleich mit Referenzspektren von unverdorbenen Paprika bei unter 1,0 (*P. carotovorum*) bzw. bei 1,7 (*A. niger*) lag.

Da Pilze und Bakterien u.a. Proteine und Kohlenhydrate verstoffwechseln (Hamatschek 2016), sind die Intensitätseinbußen der Massen wahrscheinlich dadurch zu erklären. Zum einen sinkt durch den mikrobiellen Abbau die Anzahl der spezifischen Moleküle. Zum anderen könnten die niedermolekularen Abbauprodukte eine weitere Signalsuppression der gesuchten Massen auslösen (Duncan et al. 2008). Ein derart hoher Grad an Verderb ist unter Normalbedingungen in der Gewürzproduktion jedoch nicht realistisch, da mikrobieller Verderb allenfalls an einzelnen Stellen (hot spots) auftritt. Ob die festgestellten Abweichungen bei Mischungen von unverdorbenen und mikrobiell kontaminierten Paprika noch nachweisbar wären ist fraglich, da die Intensitätseinbußen durch abundant vorhandene, unverdorbenen Probenmatrix wieder ausgeglichen werden sollten. Es kann somit gefolgert werden, dass eine mikrobielle Kontamination einer Probencharge mit der entwickelten Methodik direkt nicht nachweisbar wäre, ohne eine gezielte mikrobielle Untersuchung durchzuführen. Die Proteinprofile der beiden Mikroorganismen selbst waren in den Massenspektren nicht abbildbar. Demnach ist zu schlussfolgern, dass die Messung durch Mikroorganismen nicht beeinflusst wird und damit als robust anzusehen ist.

Ein möglicher Einfluss durch Sortenunterschiede wurde am Beispiel von Paprika und Oregano untersucht. Der Vergleich der verschiedenen Sortenspektren erfolgte immer mittels der Software Biotyper Compass Explorer. Die Datensätze wurden dabei mittels eines Dendrogrammes hierarchisch nach ihrer Ähnlichkeit/Distanz geclustert. Zur besseren Relativierung wurde jeweils der stark abweichende Datensatz des Insekts Buffalowurm miteinbezogen.

Das Paprikagewürz wird aus den Früchten bestimmter Sorten der Art *Capsicum annuum* L. hergestellt (Parthasarathy et al. 2008). Wie in Kapitel 4.1.2.4 beschrieben, wurden Massenspektren von weiteren Vertretern dieser Art (Spitzpaprika, Peperoni, zwei Chilisorten und Jalapeño) und einem Vertreter der Art *Capsicum chinense* L. (Habanero) generiert und

miteinander verglichen. Alle untersuchten Sorten, auch die beiden Chilisorten, konnten mittels der verwendeten Software eindeutig unterschieden werden. Auch wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass die Habanero, welche als einzige einer anderen Art angehört, das höchste Distanzlevel zu den anderen untersuchten Sortenproben aufweist. Jedoch zeigte das Spektrum der Jalapeño die größte Abweichung. Begründet könnte dies möglicherweise dadurch sein, dass die Jalapeño die einzige Frucht war, die unreif (grüne Farbe) untersucht wurde (vgl. Abb. 12). Auch in einer Studie von Pontiggia et al. (2019), in der die Proteinprofile von grünen und roten Tomaten verglichen wurden, zeigten sich deutliche Unterschiede. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Reifegrad einen weiteren Einflussfaktor auf die MALDI-TOF MS Spektren darstellt. Bei Paprikagewürz wäre dies zwar vernachlässigbar, da die Früchte immer im reifen Zustand geerntet werden, jedoch müsste dies für andere Gewürze berücksichtigt werden. Ein Beispiel dafür sind Fenchelsamen, die je nach Anwendung (frisch oder getrocknet) reif oder unreif geerntet werden (Lebensmittellexikon 2014).

Laut den Leitlinien der DLMBK besteht Oregano aus Blättern, Blüten und den obersten Stängeln der Pflanze *Origanum vulgare* L. In vielen Ländern jedoch werden auch andere *Origanum*-Spezies wie *Origanum onites* L. (Türkischer Oregano) und teilweise sogar Pflanzen anderer Gattung wie *Lippia origanoides* K. (Mexikanischer Oregano) als Oregano bezeichnet (Cid-Pérez et al. 2015). Die Massenspektren der beiden Subspezies von *Origanum vulgare* (*O. vulgare* subsp. *vulgare* und *O. vulgare* subsp. *hirtum*) unterschieden sich nur in Form abweichender Intensitäten einiger weniger Massen, waren sonst aber vom Profil identisch (s. Abb. 41). Dagegen wurde zum Massenspektrum von *Origanum onites* ein deutlicher Unterschied festgestellt. Diese Spezies konnte mit hohem Distanzlevel von den anderen abgegrenzt werden. Der mexikanische Oregano (*Lippia origanoides*) wies, wie erwartet, kaum mehr Ähnlichkeiten mit den *Origanum* spp. auf und besaß ein genauso großes Distanzlevel zu den anderen Sorten wie der Referenzdatensatz des Insekts Buffalowurm.

Folglich stellte sich bei Paprika und Oregano ein deutlicher Einfluss der Sorten auf die Massenspektren dar. Vor allem bei Oregano, bei dem auch verschiedene Sorten unter dem gleichen Gewürznamen „Oregano“ vermarktet werden, muss dies bei der Erstellung von Referenzspektren berücksichtigt werden. Die eigenen Ergebnisse zeigen andererseits aber auch die Möglichkeit einer schnellen Methode zur Speziesdifferenzierung auf. Differenzierungen von *Capsicum* Sorten wurden beispielsweise meist anhand von zeit- und kostenintensiven DNA-Analysen durchgeführt (Prince et al. 1995, Jeong et al. 2010). Reeve et

al. (2018) zeigten bereits, dass verschiedene Pflanzenspezies innerhalb eines Genus mittels MALDI-TOF MS unterschieden werden können. In ihrer Studie differenzierten sie erfolgreich mehrere Springkraut-Spezies und sogar vier Biotypen einer Spezies. Auch bei Fischen und Insekten gelang es, im Hinblick auf die Authentizitätsüberprüfung verschiedene Spezies mittels MALDI-TOF zu identifizieren (Campbell 2005, Bi et al. 2019).

5.3 Detektion von Produktverfälschungen

Die Spezifität und Sensitivität der entwickelten Methode wurden durch artifizielle Verfälschung mit geringwertigem Rohmaterial beurteilt. Für Paprika, Oregano und schwarzen Pfeffer wurden die in der Literatur als Verfälschungsmittel beschriebenen Tomatenschalen, Olivenblätter und Papayasamen ausgewählt (Curl et al. 1983, De 2003, Black et al. 2016). Sie wurden zu Anteilen von 5 bis 50 % (w/w) mit dem jeweiligen Gewürz gemischt. Von diesen Mischungen und den reinen Proben wurden Massenspektren generiert und verglichen (vgl. 4.1.4, 4.2.4. und 4.3.3)

Bei Paprika und Pfeffer konnten bereits ab einer Verfälschung mit 5 % Tomatenschalen bzw. Papayasamen zusätzliche Signale detektiert werden. Diese Signale waren nach Vergleich mit den Reinspektren eindeutig dem jeweiligen Verfälschungsmittel zuzuordnen. Beim Abgleich der Spektren aller Mischungsverhältnisse mit Referenzspektren von authentischen Proben ergaben sich jedoch immer noch Score Values über 1,8. Deshalb wurden die Massenspektren zusätzlich mit den MSPs der jeweiligen Verfälschungsgrade abgeglichen (vgl. Abb. 32 und 55). Die Unterschiede in der Zuordnung der Verfälschungsmuster zu den jeweiligen MSPs waren immer hochsignifikant und ließen auf eine verlässliche Identifikation schließen.

Generell sind Verunreinigungen bei Kräutern und Gewürzen wegen technischen Abläufen wie der Ernte meist nicht komplett zu vermeiden (BVL 2019). Die European Spice Association (ESA) setzte deswegen Grenzwerte von maximal 2 % Verunreinigung bei Kräutern und 1 % bei Gewürzen fest (ESA 2018). Bei Betrugsabsicht ist jedoch meist mit höheren Zusätzen von Verfälschungsmitteln zu rechnen, weswegen in dieser Arbeit mit 5 % Beimengung begonnen wurde. Zur Detektion von Verfälschungen in Paprika und schwarzem Pfeffer wurden bisher u.a. spektroskopische Verfahren verwendet (de Lima et al. 2020, Galvin-King et al. 2020). In einer Studie des Elektronikherstellers Galaxy-Scientific (2016) konnte mittels FT-NIR (Nahinfrarotspektroskopie) eine Beimengung mit Tomatenschalen schon ab einem Verfälschungsgrad von 0,5 % detektiert werden. Dies stellt eine sehr sensitive Methode dar,

jedoch sind hier die Nachweisgrenzen stark von Absorptionsstärke und -bereich des Verfälschungsmittels abhängig. Bei Pfeffer konnten Beimengungen von Maniok und Mehl in Prozentsätzen von 5-50 % ebenfalls mittels FT-NIR nachgewiesen werden (de Lima et al. 2020).

Bei der artifiziellen Verfälschung von Oregano war es nicht möglich qualitativ hochwertige Massenspektren mit ausreichend spezifischen Signalen von Olivenblättern zu generieren. Folglich konnten bei den Spektren der Verfälschungsmuster keine Abweichungen durch zusätzliche Peaks festgestellt werden. Dies könnte dadurch begründet sein, dass Olivenblätter einen hohen Gehalt an interferierenden Substanzen wie Phenolen, Ligninen, Tanninen, Kohlenhydraten und Lipiden beinhalten (Abdallah et al. 2017). Das erschwert nachweislich die Extraktion der spezifischer Moleküle, was bereits in vergangenen Studien zur Proteinextraktion von Olivenblättern und Analyse mittels Gelelektrophorese festgestellt wurde (Malik et al. 2005). Die Methodik zum Nachweis von Verfälschungen mittels MALDI-TOF MS kann folglich nur dann funktionieren, wenn auch von dem Verfälschungsmittel qualitativ hochwertige Spektren mit ausreichend spezifischen Signalen generiert werden können.

5.4 Messung von Realproben

Alle überprüften Paprikaproben aus dem Handel konnten anhand der Score Values zwischen 1,84 und 2,63 den Referenzspektren zugeordnet werden. Außerdem konnte eindeutig differenziert werden, ob Samen mitgemahlen wurden oder nicht (vgl. 4.1.5). Von den neun Oregano-Handelsproben konnten nur zwei mit Score Values über 1,7 identifiziert werden. Optisch zeigten die Massenspektren wenig Ähnlichkeit mit den erstellten Referenzspektren, jedoch waren innerhalb der unterschiedlichen Proben viele gleiche Peakmuster zu erkennen (vgl. 4.2.5). Dies ist als Hinweis zu interpretieren, dass für die Erstellung von Referenzspektren auch zusätzliche Einflussfaktoren wie Trocknung und Lagerung zu untersuchen sind. Darüber hinaus müssen eine größere Anzahl an Spezies und Subspezies miteinbezogen werden. Oregano wurde in der Vergangenheit durch Beimischung von diversen Pflanzenabfällen verfälscht (Black et al. 2016). In einer Arbeit von Hägele et al. (2019) wurden 41 Oreganoproben aus dem Handel untersucht, von denen 20 % mit Fremdmaterial gestreckt waren. Die nachgewiesenen Mengen dieser Verfälschungen variierten zwischen 24-65 % und bestanden hauptsächlich aus Oliven- und Zistrosenblättern.

Weißer Pfeffer konnte mit Score Values > 2 eindeutig identifiziert werden. Dennoch war es anhand der Referenzspektren nicht möglich, weißen von schwarzem Pfeffer zu differenzieren. Gründe dafür sind vermutlich, dass es sich bei beiden Farbvarianten um dieselbe Pflanze handelt. Die verschiedenen Farben resultieren dabei lediglich aus unterschiedlichen Erntezeitpunkten und Produktionsschritten (Wenning et al. 2018). Bei zwei der schwarzen Pfefferproben konnten mit Score Values unter 1,7 keine eindeutige Identifikation erreicht werden (vgl. 4.3.4). Das erhöhte Rauschen und die verminderte Signalintensität könnte auf einen erhöhten Gehalt an Störsubstanzen hinweisen. Es ist bekannt, dass Pfeffer mit Fremdmaterial wie Papayasamen oder Chilipulver verfälscht wird (Pruthi et al. 1969, Parvathy et al. 2014). Auch verwenden Betrüger entfettete Abfallprodukte der Pfefferfrucht, die durch die Extraktion von funktionellen Pflanzenbestandteilen wie Piperin und ätherischen Ölen entstehen (Wilde et al. 2019). Dies könnte ebenfalls verminderte Intensitäten der Massen als Folge haben.

5.5 Möglichkeiten und Grenzen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen geben erste Aufschlüsse über die Anwendbarkeit der MALDI TOF MS zur Authentizitätskontrolle von Kräutern und Gewürzen. Der Ansatz für den gezielten Nachweis von Verfälschungen (target approach) kann aufgrund der Vielzahl bekannter und unbekannter Möglichkeiten der Beimengungen nur partiell für die Authentizitätskontrolle erfolgreich sein (McGrath et al. 2018). Vielversprechender sind daher non-target approach-Ansätze, bei denen Unterschiede zu authentischen Referenzen analytisch erfasst werden. Mögliche Verfahren dafür sind u.a. FTIR oder NMR in Kombination mit multivariater Datenanalyse (Chemometrie) (Oliveira et al. 2019, Kucharska-Ambrożej et al. 2020).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten, dass auch die MALDI-TOF MS einen guten Ansatz für die nicht-zielgerichtete Detektion von Verfälschungen bietet. Es war möglich, qualitativ hochwertige und reproduzierbare Massenspektren von den drei ausgewählten Gewürzen Paprika, Oregano und Pfeffer zu generieren. Dafür wurden Methoden zur Präanalytik und Messung entwickelt und optimiert. Die Bestimmung von Einflussfaktoren stellte sich grundsätzlich als wichtige Voraussetzung für die Erstellung von authentischen Referenzspektren dar. So können die Trocknung, ein Sortenunterschied oder unterschiedliche Bestandteile der Pflanze zu einer Änderung der Zusammensetzung führen und somit die

Qualität der Messung stark beeinflussen. Gleichzeitig zeigte dies jedoch die Möglichkeit, z.B. Speziesdifferenzierungen mittels MALDI-TOF MS viel schneller und mit geringeren Verbrauchskosten durchzuführen als beispielsweise mittels DNA-Analysen (Prince et al. 1995, Jeong et al. 2010).

Mithilfe der generierten Referenzspektren war bei Paprika und Pfeffer eine Differenzierung von authentischen und künstlich verfälschten Proben ab einem Verfälschungsgrad von 5 % möglich. Dies deutet auf eine sehr sensitive Unterscheidungsmöglichkeit durch MALDI-TOF MS hin. Auch die geringen Verbrauchskosten und die Schnelligkeit dieser Methode (wenige Stunden bis zum Ergebnis) sind für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie von großem Vorteil.

Für robuste und aussagekräftige Ergebnisse sind zum einen jedoch deutlich mehr authentische Gewürzproben und eine entsprechend größere Datenbasis nötig und zum anderen müssen, wie die Messung der Handelsproben gezeigt hat, weitere Einflussfaktoren wie z.B. Lagerung oder klimatische Einflüsse bestimmt werden. Außerdem sind für die praktische Anwendung und die Optimierung des Verfahrens weitere Beimischungen zu testen.

Um die Grenzen der Methode, wie beim Pfeffer an der Differenzierung zwischen schwarzen und weißen Pfeffer dokumentiert, zu bestimmen, müssen weitere Untersuchungen z.B. hinsichtlich verschiedener geographischer Ursprünge durchgeführt werden. Für diese Art der Verfälschung hat sich bisher die Stabilisotopen-Analyse bewährt. Sie wurde erfolgreich angewendet, um Paprika aus verschiedenen Ländern zu differenzieren (Brunner et al. 2010). Auch zeigte die Verfälschung von Oregano mit Olivenblättern, dass eine Authentizitätskontrolle mittels MALDI-TOF MS nur dann erfolgreich sein kann, wenn von dem Verfälschungsmittel ebenfalls hochwertige Spektren mit spezifischen Signalen generiert werden können.

6 Zusammenfassung

Kräuter und Gewürze sind Produkte, die aufgrund sehr hoher Rohstoffpreise und teils unübersichtlicher Handelswege häufig von Lebensmittelbetrug betroffen sind. Aus diesem Grund steigt der Bedarf an verlässlichen und routinemäßig anwendbaren Analysemethoden zur Authentizitätskontrolle. Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob mittels MALDI-TOF MS robuste Fingerprint-Spektrendatenbanken von Paprika, Oregano und Pfeffer generiert werden können. Zusätzlich wurden Faktoren überprüft, welche diese beeinflussen. Außerdem wurde untersucht, ob und wie sensitiv und ab welchem Prozentsatz ausgewählte Verfälschungen detektiert werden können.

Für alle drei Gewürze wurden Extraktionsmethoden entwickelt, mit denen qualitativ hochwertige, reproduzierbare und charakteristische Massenspektren im Bereich von 2-16 kDa generiert werden konnten. Vor allem das Aufreinigen der Proben mit ausgewählten Lösungsmitteln führte dabei zu einer deutlichen Verbesserung der Spektrenqualität.

Es konnten mehrere Einflussfaktoren bestimmt werden, welche sich teilweise stark auf die Massenspektren auswirkten. Bei Paprika zeigten sich zum einen deutliche Unterschiede in den Spektren von gefriergetrockneten und luftgetrockneten Proben. Zum anderen wiesen die Samen deutlich mehr und andere spezifische Massen als das Fruchtfleisch auf. Eine künstliche Kontamination von Paprika mit zwei ausgewählten Verderbserregern führte zu einer Intensitätsabnahme der spezifischen Massen. Auch stellte sich bei Oregano und Paprika ein deutlicher Sortenunterschied heraus.

Mit den experimentell überprüften Extraktionsprotokollen können artifizielle Verfälschungen von Paprika (Beimischung von Tomatenschalen) und schwarzem Pfeffer (Beimischung von Papayasamen) ab einem Anteil von 5 % mit der MALDI-TOF-MS-Methode identifiziert werden. Eine Beimengung von Olivenblättern zu Oregano konnte dagegen nicht nachgewiesen werden, da für Olivenblätter keine qualitativ hochwertigen Massenspektren generiert werden konnten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mittels MALDI-TOF MS auf schnellem und einfachem Weg artifizielle Verfälschungen ausgewählter Gewürze detektiert werden können. Wichtige Voraussetzungen dafür sind die Generierung von hochwertigen Massenspektren mit ausreichend spezifischen Signalen, sowohl von der authentischen Probe als auch von dem Verfälschungsmittel und die Kenntnis über die möglichen Einflussfaktoren auf die Massenspektren.

7 Summary

Herbs and spices are often the target for food fraud due to their high raw material prices and the non-transparent, complex supply chains. For this reason, the need for reliable analytical methods, that can be widely applied in practice is increasing. The aim of this work was to check if a robust MALDI-TOF MS-based fingerprint database of paprika, oregano and pepper can be generated. In addition, influencing factors were checked. It was also explored how sensitive and in which percentage selected adulterations can be detected.

Extraction methods have been developed for all three spices. With those methods high quality, reproducible and characteristic mass spectra in the range of 2-16 kDa could be generated. In particular, washing the samples with selected solvents greatly enhanced the quality of the mass spectra.

Several influencing factors could be determined, some with strong effects on the mass spectra. In the case of paprika there were clear differences in the spectra of freeze-dried and air-dried samples. In addition, the seeds had significantly more and different specific masses than the pulp. Artificial contamination of paprika with two selected spoilage pathogens led to a decrease in the intensity of the specific masses. There was also a clear difference in the variety of oregano and paprika.

Artificial adulterations of paprika (addition of tomato peel) and black pepper (addition of papaya seeds) from a proportion of 5 % could be identified using the extraction protocols developed. An addition of olive leaves to oregano, however, could not be detected, as no high-quality mass spectra could be generated for olive leaves.

In summary, it could be shown that MALDI-TOF MS can detect artificial adulterations of selected spices in a fast and easy way. The most important prerequisites for this are the generation of high-quality mass spectra with sufficiently specific signals, both from the authentic sample and from the adulterant, and knowledge of the possible influencing factors on the mass spectra.

8 Literaturverzeichnis

- Abdallah, M. B., Trupiano, D., Youssef, N. and Scippa, G. (2017). "An Efficient Method for Olive Leaves Proteins Extraction and Two- Dimensional Electrophoresis." *The Natural Products Journal* 7: 12-17
- Almela, L., Rabe, V., Sánchez, B., Torrella, F., López-Pérez, J. P., Gabaldón, J. A. and Guardiola, L. (2007). "Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material." *Food Microbiology* 24(4): 319-327
- Anhalt, J. P. and Fenselau, C. (1975). "Identification of bacteria using mass spectrometry." *Analytical Chemistry* 47(2): 219-225
- Anonymus (2012). MALDI Biotyper 4.1 User Manual. Bremen, Bruker Daltoniks GmbH
- ASTA (2004). "American Spice Trade Association: Spice Adulteration – White Paper." zuletzt aufgerufen am 03.12.2020, <http://docshare04.docshare.tips/files/6810/68105104.pdf>
- ASTA (2016). "American Spice Trade Association: SPICE LIST." zuletzt aufgerufen am 07.10.2020, <https://www.astaspice.org/advocacy-regulatory-issues/complying-with-u-s-policy-regulations/spice-list/>
- Bahr, U., Deppe, A., Karas, M., Hillenkamp, F. and Giessmann, U. (1992). "Mass spectrometry of synthetic polymers by UV-matrix-assisted laser desorption/ionization." *Analytical Chemistry* 64(22): 2866-2869
- Bang, J. S., Oh, D. H., Choi, H. M., Sur, B.-J., Lim, S.-J., Kim, J. Y., Yang, H.-I., Yoo, M. C., Hahm, D.-H. and Kim, K. S. (2009). "Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models." *Arthritis research & therapy* 11(2): R49-R49
- Baratta, M. T., Dorman, H. J. D., Deans, S. G., Biondi, D. M. and Ruberto, G. (1998). "Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils." *Journal of Essential Oil Research* 10(6): 618-627
- Beavis, R. C. (1992). "Matrix-assisted ultraviolet laser desorption: Evolution and principles." *Organic Mass Spectrometry* 27(6): 653-659
- Beavis, R. C., Chaudhary, T. and Chait, B. T. (1992). " α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectrometry." *Organic Mass Spectrometry* 27(2): 156-158
- Behr, A. and Seidensticker, T. (2017). Einführung in die Chemie nachwachsender Rohstoffe: Vorkommen, Konversion, Verwendung. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg
- Belitz, H. D., Grosch, W. and Schieberle, P. (2013). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Berlin, Springer Berlin Heidelberg
- Berke, T. G. and Shieh, S. C. (2012). Capsicum cultivares. Handbook of Herbs and Spices. K. V. Peter. Cambridge, Woodhead Publishing Limited. Vol. 1: S. 116 - 130

- BfR (2016a). "Bundesinstitut für Risikobewertung, FAQ des BfR: Fragen und Antworten zu Lebensmittelbetrug und Authentizitätsprüfung." zuletzt aufgerufen am 01.03.2021 <https://www.bfr.bund.de/cm/343/fragen-und-antworten-zu-lebensmittelbetrug-und-authentizitaetspruefung.pdf>
- BfR (2016b). Bundesinstitut für Risikobewertung: Gewürze und Kräuter: Zutaten, die ein gesundheitliches Risiko bergen können. Pressemitteilung 19/2016
- Bi, H., Zhong, C., Shao, M., Wang, C., Yi, J., Qiao, L. and Zhang, J. (2019). "Differentiation and authentication of fishes at the species level through analysis of fish skin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 33(16): 1336-1343
- Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G. and Prod'homme, G. (2010). "Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory." *Journal of Clinical Microbiology* 48(5): 1549-1554
- Black, C., Haughey, S. A., Chevallier, O. P., Galvin-King, P. and Elliott, C. T. (2016). "A comprehensive strategy to detect the fraudulent adulteration of herbs: The oregano approach." *Food Chemistry* 210: 551-557
- BMEL (2008). "Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Leitsätze für Gewürze und andere würzende Zutaten." zuletzt aufgerufen am 07.10.2020, https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/Lebensmittel-Kennzeichnung/LeitsaetzeGewuerze.pdf?__blob=publicationFile&v=2
- Bononi, M. and Tateo, F. (2012). "LC-ESI-MS/MS identification of oleuropein as marker of *olea europaea* L. leaves used as a bulking agent in ground oregano and sage." *Italian Journal of Food Science* 23: 245 - 251
- Breitner, M. (2020). *Wie man Peperoni in Ihrem Zuhause anbaut. Im Garten, in Töpfen oder auf dem Balkon: Die Lieblingssammlung für diejenigen, die den Bio-Garten und gutes Essen lieben.* Sabaudia, Bruno Del Medico Editore
- Bruker (2017). "Gebrauchsanweisung IVD Matrix HCCA-portioned." zuletzt aufgerufen am 15.12.2020 https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/InstructionForUse/IFU_8290200_IVD_HCCA_de_K.pdf
- Brunner, M., Katona, R., Stefánka, Z. and Prohaska, T. (2010). "Determination of the geographical origin of processed spice using multielement and isotopic pattern on the example of Szegedi paprika." *European Food Research and Technology* 231(4): 623-634
- Buroh, N., Gödert, D., Haumaier, M. and Westermann-Studios (2008). *Das große Buch der Kräuter & Gewürze.* Leipzig, Teubner, ein Imprint von GRÄFE UND UNZER Verlag GmbH
- Buskirk, A., Hettick, J., Chipinda, I., Law, B., Siegel, P., Slaven, J., Green, B. and Beezhold, D. (2011). "Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi." *Analytical biochemistry* 411: 122-128

- Butt, M. S., Pasha, I., Sultan, M. T., Randhawa, M. A., Saeed, F. and Ahmed, W. (2013). "Black pepper and health claims: a comprehensive treatise." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53(9): 875-886
- BVL (2017). "Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Kurz erklärt: Lebensmittelfälschern auf der Spur." zuletzt aufgerufen am 15.07.2020, <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Videos/BVL-Erklaerfilm-Lebensmittelfaelscher.html?nn=11035236>
- BVL (2018). "Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Lebensmittelsicherheit – Wer macht was?", zuletzt aufgerufen am 11.02.2019 https://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/01_WerMachtWas/Im_WerMachtWas_node.html
- BVL (2019). "BVL-Report · 15.1: Bundesweiter Überwachungsplan 2019 Gemeinsamer Bericht des Bundes und der Länder." zuletzt aufgerufen am 02.02.2021 https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/02_BUEp_dokumente/BUEp_Bericht_2019.pdf?__blob=publicationFile&v=9
- BVL (2020). "Hot and spicy – Chili, Pfeffer und Co. im Blickpunkt." zuletzt aufgerufen am 06.11.2020 https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/01_lebensmittel/2020/2020_05_06_PI_Gewuerze.html
- Calvano, C. D., De Ceglie, C., Monopoli, A. and Zambonin, C. G. (2012). "Detection of sheep and goat milk adulterations by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests." *Journal of Mass Spectrometry* 47(9): 1141-1149
- Campbell, P. M. (2005). "Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling." *Systematic Entomology* 30(2): 186-190
- Cantarelli, M. Á., Moldes, C. A., Marchevsky, E. J., Azcarate, S. M. and Camiña, J. M. (2020). "Low-cost analytic method for the identification of Cinnamon adulteration." *Microchemical Journal* 159: 105513 (105511-105515)
- Capasso, R., Izzo, A. A., Borrelli, F., Russo, A., Sautebin, L., Pinto, A., Capasso, F. and Mascolo, N. (2002). "Effect of piperine, the active ingredient of black pepper, on intestinal secretion in mice." *Life Sciences* 71(19): 2311-2317
- Cassagne, C., Cella, A., Suchon, P., Normand, A., Ranque, S. and Piarroux, R. (2013). "Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory." *Medical Mycology* 51(4): 371-377
- Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M. and Šebela, M. (2014). "Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry." *Biotechnology Advances* 32(1): 230-241
- Chipault, J. H., Mizuno, G. R., Hawkins, J. M. and Lundberg, W. O. (1952). "The antioxidant properties of natural spices a, b." *Journal of Food Science* 17(1-6): 46-55

- Choi, O. and Kim, J. (2013). "Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense Causing Soft Rot on Paprika in Korea." *Journal of Phytopathology* 161(2): 125-127
- Cid-Pérez, T., Torres-Muñoz, J., Nevarez-Moorillon, G., Palou, E. and López-Malo, A. (2015). "Chemical characterization and antifungal activity of *Poliomintha longiflora* Mexican oregano." *Journal of Essential Oil Research* 28: 1-9
- Cozzolino, R., Passalacqua, S., Salemi, S. and Garozzo, D. (2002). "Identification of adulteration in water buffalo mozzarella and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* 37(9): 985-991
- Curl, C. L. and Fenwick, G. R. (1983). "On the determination of papaya seed adulteration of black pepper." *Food Chemistry* 12(4): 241-247
- Danis, P. O., Karr, D. E., Mayer, F., Holle, A. and Watson, C. H. (1992). "The analysis of water-soluble polymers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry." *Organic Mass Spectrometry* 27(7): 843-846
- De, A. K. (2003). *Capsicum: The Genus Capsicum*. London, Taylor & Francis
- de Lima, A. B. S., Batista, A. S., de Jesus, J. C., de Jesus Silva, J., de Araújo, A. C. M. and Santos, L. S. (2020). "Fast quantitative detection of black pepper and cumin adulterations by near-infrared spectroscopy and multivariate modeling." *Food Control* 107: 106802
- Dhanya, K., Syamkumar, S., Jaleel, K. and Sasikumar, B. (2008). "Random amplified polymorphic DNA technique for detection of plant based adulterants in chilli powder (*Capsicum annum*)." *Journal of Spices and Aromatic Crops* 17: 75-81
- Dhanya, K., Syamkumar, S., Siju, S. and Sasikumar, B. (2011). "Sequence characterized amplified region markers: A reliable tool for adulterant detection in turmeric powder." *Food Research International* 44(9): 2889-2895
- DLMBK (1995). "Deutsche Lebensmittelbuch Kommission: Leitsätze für Gewürze und andere würzende Zutaten."
- Dorynek, M. (2019). *Implementierung und Maßnahmen gegen Food Fraud - Master Thesis, Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg Department Ökotrophologie. Hamburg*
- Drevinek, M., Dresler, J., Klimentova, J., Pisa, L. and Hubalek, M. (2012). "Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria." *Letters in Applied Microbiology* 55(1): 40-46
- Dudenredaktion (2007). *Duden, Das große Fremdwörterbuch. Herkunft und Bedeutung der Fremdwörter*. Mannheim/Leipzig/Wien, Dudenverlag
- Duncan, M. W., Nedelkov, D., Walsh, R. and Hattan, S. J. (2016). "Applications of MALDI mass spectrometry in clinical chemistry." *Clinical chemistry* 62(1): 134-143

- Duncan, M. W., Roder, H. and Hunsucker, S. W. (2008). "Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." *Briefings in functional genomics & proteomics* 7(5): 355-370
- Ehlers, M. (2003). Entwicklung und Optimierung einer externen Ionenquelle in Kombination mit einem Quadrupolionenfallen – Hybridmassenspektrometer und erste Untersuchungen zur Fragmentierung sowie Photoionisationseffizienz, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Kiel
- El-Adawy, T. A. and Taha, K. M. (2001). "Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(3): 1253-1259
- Elssner, T., Kostrzewa, M., Maier, T. and Kruppa, G. (2011). *Microorganism Identification Based On MALDI-TOF-MS Fingerprints*. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. Dordrecht, Banoub, J.: S.
- Ernst, M., Silva, D. B., Silva, R., Monge, M., Semir, J., Vêncio, R. Z. and Lopes, N. P. (2015). "A metabolomic protocol for plant systematics by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of flight mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta* 859: 46-58
- ESA (2018). "European Spice Association Quality Minima Document Rev. 5." zuletzt aufgerufen am 02.02.2021 <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiC1ZiEjMvuAhVE8BQKHdCuA3MQFjAAegQIAxAC&url=https%3A%2F%2Fwww.esa-spices.org%2Fdownload%2Fesa-qmd-rev-5-update-as-per-esa-tc-26-03-18.pdf&usg=AOvVaw0EZWudAxl-RgwB7q7qrYvg>
- Esteban-Cuesta, I., Drees, N., Ulrich, S., Stauch, P., Sperner, B., Schwaiger, K., Gareis, M. and Gottschalk, C. (2018). "Endogenous microbial contamination of melons (*Cucumis melo*) from international trade: an underestimated risk for the consumer?" *J Sci Food Agric* 98(13): 5074-5081
- EU-Parlament (2013). "Bericht über die Nahrungsmittelkrise, Betrug in der Nahrungskette und die entsprechende Kontrolle (2013/2091 INI)." zuletzt aufgerufen am 10.12.2020 https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/A-7-2013-0434_EN.html
- EU-Parlament (2016). "Amtsblatt der Europäischen Union: Bekämpfung der Nahrungsmittelkrise und des Betrugs in der Lebensmittelversorgungskette
- Entschließung des Europäischen Parlaments vom 14. Januar 2014 zur Nahrungsmittelkrise, Betrug in der Nahrungskette und die entsprechende Kontrolle (2013/2091(INI))." zuletzt aufgerufen am 01.03.2021 [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:52014IP0011\(01\)&from=EL](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:52014IP0011(01)&from=EL)
- Europäische-Kommission (2014). "MEMO/14/113 vom 14. Februar 2014 Brüssel Titel: Pferdefleischskandal: ein Jahr danach, wir haben gehandelt!", zuletzt aufgerufen am 03.12.2020, https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/de/MEMO_14_113

- Europäische-Kommission (2018). "The EU Food Fraud Network." zuletzt aufgerufen am 15.07.2020, https://ec.europa.eu/food/safety/food-fraud/ffn_en
- Farag, M. A., Hegazi, N., Dokhalahy, E. and Khattab, A. R. (2020). "Chemometrics based GC-MS aroma profiling for revealing freshness, origin and roasting indices in saffron spice and its adulteration." *Food Chemistry* 331: 127358
- Farmiloe, F. J., Cornford, S. J., Coppock, J. B. M. and Ingram, M. (1954). "The survival of *Bacillus subtilis* spores in the baking of bread." *Journal of the science of food and agriculture* 5(6): 292-304
- FDA (2015). "Food and Drug Administration (FDA) consumer advice on products containing ground cumin with undeclared peanuts." zuletzt aufgerufen am 15.09.2020, <http://wayback.archive-it.org/7993/20171114232613/https://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/SafetyAlertsAdvisories/ucm434274.htm>
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., Muñoz-Bellido, J. L. and González-Buitrago, J. M. (2011). "Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method." *Clinical Microbiology and Infection* 17(7): 1007-1012
- Fíla, J., Čapková, V., Feciková, J. and Honys, D. (2011). "Impact of homogenization and protein extraction conditions on the obtained tobacco pollen proteomic patterns." *Biologia Plantarum* 55(3): 499-506
- Flaudrops, C., Armstrong, N., Raoult, D. and Chabrière, E. (2015). "Determination of the animal origin of meat and gelatin by MALDI-TOF-MS." *Journal of Food Composition and Analysis* 41: 104-112
- Franke, E., Lieberei, R. and Reisdorff, C. (2012). *Nutzpflanzen*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag
- Fraser, P. D., Enfissi, E. M., Goodfellow, M., Eguchi, T. and Bramley, P. M. (2007). "Metabolite profiling of plant carotenoids using the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry." *The Plant Journal* 49(3): 552-564
- Frimpong, G. K., Adekunle, A. A., Ogundipe, O. T., Solanki, M. K., Sadhasivam, S. and Sionov, E. (2019). "Identification and Toxigenic Potential of Fungi Isolated from Capsicum Peppers." *Microorganisms* 7(9): 303 (301-310)
- Fuchs, J., Krause, A., Skuballa, J., Eisenbeiss, F., Pietsch, K. and Wind, C. (2017). "Fischarten-Identifizierung mittels MALDI-TOF MS." *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle, Sonderausgabe*: 26.9.–29.9.2017: 149
- Galaxy-Scientific (2016). "Fast Detection of Paprika Adulteration by FT-NIR Spectroscopy." zuletzt aufgerufen am 27.01.2021 <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=13251>
- Galvin-King, P., Haughey, S. A. and Elliott, C. T. (2018). "Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection." *Food Control* 88: 85-97

- Galvin-King, P., Haughey, S. A. and Elliott, C. T. (2020). "The Detection of Substitution Adulteration of Paprika with Spent Paprika by the Application of Molecular Spectroscopy Tools." *Foods* (Basel, Switzerland) 9(7): 944
- Gewürzindustrie (2018). Fachverband der Gewürzindustrie e.V.: Marktentwicklung der Gewürzindustrie 2018. Bonn
- Gey, M. (2008). *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*, Springer Berlin Heidelberg
- Giavalisco, P., Nordhoff, E., Lehrach, H., Gobom, J. and Klose, J. (2003). "Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis." *Electrophoresis* 24(1-2): 207-216
- Gillis, A., Santana, M. A., Rodríguez, M. and Romay, G. (2017). "First Report of Bell Pepper Soft-Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Venezuela." *Plant Disease* 101(9): 1671-1674
- Gottschalk, C. and Wudy, S. (2018). "Status methodischer Ansätze zur Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln."
- Gross, J. H. (2019). *Massenspektrometrie: Spektroskopiekurs kompakt*, Springer Berlin Heidelberg
- Gross, J. H. and Beifuss, K. (2012). *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*, Springer Berlin Heidelberg
- Hachani, J., Duban-Deweere, S., Pottiez, G., Renom, G., Flahaut, C. and Périni, J. M. (2011). "MALDI-TOF MS profiling as the first-tier screen for sickle cell disease in neonates: matching throughput to objectives." *PROTEOMICS - Clinical Applications* 5(7-8): 405-514
- Hägele, F., Kapp, T. and Lachnit, S. (2019). "Oregano – an Aromatic, but Loaded Culinary Herb. Part II: Pesticides and Olive Leaves." zuletzt aufgerufen am 02.02.2021 https://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=0&Thema_ID=5&ID=3026&Pdf=No&lang=EN
- Hagh-Nazari, S. and Keifi, N. (2007). "Saffron and various fraud manners in its production and trades." *International Society for Horticultural Science (ISHS)* 739
- Hamatschek, J. (2016). *Lebensmitteltechnologie: Die industrielle Herstellung von Lebensmitteln aus landwirtschaftlichen Rohstoffen*. Stuttgart, Eugen Ulmer KG
- Harris, D. C., Werner, G. and Werner, T. (2014). *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. New York, Springer Berlin Heidelberg
- Heidarbeigi, K., Mohtasebi, S. S., Foroughirad, A., Ghasemi-Varnamkhasti, M., Rafiee, S. and Rezaei, K. (2015). "Detection of Adulteration in Saffron Samples Using Electronic Nose." *International Journal of Food Properties* 18(7): 1391-1401

- Heiss, R. and Eichner, K. (2002). Chemische Veränderungen von Lebensmitteln bei der Verarbeitung und Lagerung und deren Vermeidung. Haltbarmachen von Lebensmitteln: Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Qualitätserhaltung. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: S. 4-56
- Hillenkamp, F., Jaskolla, T. W. and Karas, M. (2013). The MALDI Process and Method. MALDI MS. F. Hillenkampf and J. Peter-Katalinic, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: S. 1-40
- Hillenkamp, F. and Peter-Katalinic, J. (2007). Maldi MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications. Weinheim, Wiley-VCH
- Hoffbauer, J. (2017). "Das nationale System zur Bekämpfung von Lebensmittelbetrug." Journal of Consumer Protection and Food Safety 12(1): 23-26
- Hong, E., Lee, S. Y., Jeong, J. Y., Park, J. M., Kim, B. H., K., K. and Chun, H. S. (2017). "Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category." Journal of the science of food and agriculture 97 3877-3896
- Hu, B., Xin, G., So, P.-K. and Yao, Z.-P. (2015). "Thin layer chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry for direct analysis of raw samples." Journal of Chromatography A 1415: 155-160
- Hu, Y., Wang, S., Wang, S. and Lu, X. (2017). "Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy in food adulteration determination: the example of Sudan dye I in paprika powder." Scientific Reports 7: 1
- Hua, G. K. H., Ali, E. and Ji, P. (2020). "Characterization of bacterial pathogens causing fruit soft rot and stem blight of bell pepper in Georgia, USA." Journal of Plant Pathology 102(2): 311-318
- Huang, W., Li, F., Liu, Y. and Long, C. (2015). "Identification of *Crocus sativus* and its Adulterants from Chinese Markets by using DNA Barcoding Technique." Iranian Journal of Biotechnology 13(1): 36-42
- Idelevich, E. A., Sparbier, K., Kostrzewa, M. and Becker, K. (2018). "Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay." Clinical Microbiology and Infection 24(7): 738-743
- Ietswaart, J. H. (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). Amsterdam, Leiden University Press
- Isaacson, T., Damasceno, C. M. B., Saravanan, R. S., He, Y., Catalá, C., Saladié, M. and Rose, J. K. C. (2006). "Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues." Nature Protocols 1(2): 769-774
- Islam, N., Lonsdale, M., Upadhyaya, N. M., Higgins, T. J., Hirano, H. and Akhurst, R. (2004). "Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis." Proteomics 4(7): 1903-1908

- ITC (2018). "International Trade Centre: Trade Map - International Trade Statistics." zuletzt aufgerufen am 11.10.2020, https://www.trademap.org/tradestat/Country_SelProduct_TS.aspx?vpm=1%7c%7c%7c%7c%7c09%7c%7c%7c2%7c1%7c1%7c2%7c2%7c1%7c2%7c1%7c%7c1
- Jeong, H. J., Jo, Y. D., Park, S. W. and Kang, B. C. (2010). "Identification of Capsicum species using SNP markers based on high resolution melting analysis." *Genome* 53(12): 1029-1040
- Jin, W., Mujumdar, A., Zhang, M. and Shi, W. (2017). "Novel Drying Techniques for Spices and Herbs: a Review." *Food Engineering Reviews* 10: 34-45
- Kahl, T., Kreuter, P. M. and Vogel, C. (2015). *Culinaria balcanica*. Berlin, Frank & Timme
- Khan, M. H., Saleem, Z., Ahmad, M., Sohaib, A., Ayaz, H. and Mazzara, M. (2020). "Hyperspectral Imaging for Color Adulteration Detection in Red Chili." *Applied Sciences* 10 (5955): 1-17
- Kim, E.-H., Lee, S.-Y., Baek, D.-Y., Park, S.-Y., Lee, S.-G., Ryu, T.-H., Lee, S.-K., Kang, H. J., Kwon, O.-H., Kil, M. and Oh, S.-W. (2019). "A comparison of the nutrient composition and statistical profile in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) based on genetic and environmental factors." *Applied Biological Chemistry* 62(48): 1-13
- Kintzios, S. E. (2002). *Oregano: The genera Origanum and Lippia*. London, CRC Press
- Kucharska-Ambrożej, K. and Karpinska, J. (2020). "The application of spectroscopic techniques in combination with chemometrics for detection adulteration of some herbs and spices." *Microchemical Journal* 153: 1-9
- Lebensmittellexikon (2014). "Fenchelsamen, Fenchelfrüchte." zuletzt aufgerufen am 26.01.2021 <https://www.lebensmittellexikon.de/f0000910.php>
- Lee, S., Lohumi, S., Lim, H., Gotoh, T., Goto, T., Cho, B., Kim, M. S. and Lee, S. (2015). "Development of a Detection Method for Adulterated Onion Powder using Raman Spectroscopy." *Journal of The Faculty of Agriculture Kyushu University* 60: 151-156
- Lehmacher, A., Bockemühl, J. and Aleksic, S. (1995). "Nationwide outbreak of human salmonellosis in Germany due to contaminated paprika and paprika-powdered potato chips." *Epidemiology and Infection* 115(3): 501-511
- Lema, A. A., Mudansiru, A., Alexander, B. A. and Sakinatu, M. J. (2018). "Evaluation of Fungal Species Isolated from Three Different Varieties of Pepper (*Capsicum chinense*, *C. frutescens* and *C. annum* L.) in Dutsin-ma, Katsina State." *ANNALS OF BIOLOGICAL RESEARCH* 6 (1): 13-17
- Lieberei, R., Franke, W. and Reisdorff, C. (2007). *Nutzpflanzenkunde: 118 Tabellen*. Stuttgart / New York, Thieme
- Liebscher, B. (2014). *SEAT Ein Programm zur Simulation und Analyse experimenteller Massenspektren*, Hochschule Mittweida Fakultät Mathematik, Naturwissenschaft, Informatik. Mittweida

- Lindman, C. A. M. (1922). *Bilder ur nordens flora*. Stockholm, Wahlström & Widstrand
- Lohumi, S., Lee, S., Lee, H. and Cho, B. (2015). "A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration." *Trends in Food Science & Technology* 46(1): 85-98
- Makri, O. (2002). *Cultivation of oregano. Oregano, the genera Origanum and Lippia*. S. E. Kintzios. London, Taylor and Francis: S. 153-162
- Malik, N. S. A. and Bradford, J. M. (2005). "A simple protein extraction method for proteomic studies on olive leaves." *Journal of Food, Agriculture and Environment* 3: 246-248
- Marieschi, M., Torelli, A., Bianchi, A. and Bruni, R. (2011). "Detecting *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. by means of SCAR-PCR in commercial samples of Mediterranean oregano." *Food Control* 22(3): 542-548
- Marieschi, M., Torelli, A., Bianchi, A. and Bruni, R. (2011). "Development of a SCAR marker for the identification of *Olea europaea* L.: A newly detected adulterant in commercial Mediterranean oregano." *Food Chemistry* 126(2): 705-709
- Marieschi, M., Torelli, A., Poli, F., Sacchetti, G. and Bruni, R. (2009). "RAPD-Based Method for the Quality Control of Mediterranean Oregano and Its Contribution to Pharmacognostic Techniques." *J Agric Food Chem* 57(5): 1835-1840
- Marvin, L. F., Roberts, M. A. and Fay, L. B. (2003). "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry." *Clinica Chimica Acta* 337(1): 11-21
- Matsuda, N., Matsuda, M., Notake, S., Yokokawa, H., Kawamura, Y., Hiramatsu, K. and Kikuchi, K. (2012). "Evaluation of a Simple Protein Extraction Method for Species Identification of Clinically Relevant Staphylococci by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry." *Journal of Clinical Microbiology* 50(12): 3862-3866
- McGrath, T. F., Haughey, S. A., Patterson, J., Fauhl-Hassek, C., Donarski, J., Alewijn, M., van Ruth, S. and Elliott, C. T. (2018). "What are the scientific challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud testing and how can they be addressed? – Spectroscopy case study." *Trends in Food Science & Technology* 76: 38-55
- McLeod, M. J., Guttman, S. I. and Eshbaugh, W. H. (1982). "Early evolution of chili peppers (*Capsicum*)." *Economic Botany* 36(4): 361-368
- Mehta, A. and Silva, L. P. (2015). "MALDI-TOF MS profiling approach: how much can we get from it?" *Frontiers in plant science* 6(184)
- Miki, A., Katagi, M., Kamata, T., Zaitso, K., Tatsuno, M., Nakanishi, T., Tsuchihashi, H., Takubo, T. and Suzuki, K. (2011). "MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair." *Journal of Mass Spectrometry* 46(4): 411-416

- Müller, A. (2018). "DLG-Expertenwissen: Food Fraud Lebensmittelverfälschungen: Möglichkeiten und Chancen zur Risikominimierung in komplex vernetzten Wertschöpfungsketten." zuletzt aufgerufen am 13.12.2020, https://www.dlg.org/fileadmin/downloads/lebensmittel/themen/publikationen/expertenwissen/lebensmittelsensorik/2018_11_Expertenwissen_FoodFraud.pdf
- Nabors, M. W. (2007). Botanik. München, Pearson Deutschland GmbH
- Nakatani, N. and Kikuzaki, H. (1987). "A New Antioxidative Glucoside Isolated from *Oregano* (*Origanum vulgare* L.)." *Agricultural and Biological Chemistry* 51(10): 2727-2732
- Neumann, K. and Matz, G. (1955). "Methoden und Anwendungen der Gefriertrocknung." *Chemie Ingenieur Technik* 27(1): 5-10
- Nguyen, H.-Q., Lee, D., Kim, Y., Kim, M. S., Jang, K.-S. and Kim, J. Y. (2019). "Recrystallization of dried droplets using acetonitrile to improve surface homogeneity in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis with 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 33(18): 1481-1484
- Nöhle, U. (2017). Food Fraud – Lebensmittelbetrug in Zeiten der Globalisierung. Hamburg, B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG
- Oliveira, M. M., Cruz-Tirado, J. P. and Barbin, D. F. (2019). "Nontargeted Analytical Methods as a Powerful Tool for the Authentication of Spices and Herbs: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18(3): 670-689
- Osman, A. G., Raman, V., Haider, S., Ali, Z., Chittiboyina, A. G. and Khan, I. A. (2019). "Overview of Analytical Tools for the Identification of Adulterants in Commonly Traded Herbs and Spices." *Journal of AOAC International* 102(2): 376-385
- Pabst, G. (1887). Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte. Leipzig, Eugen Köhler
- Pareige, C., Lefebvre-Ulrikson, W., Vurpillot, F. and Sauvage, X. (2016). Chapter Five - Time-of-Flight Mass Spectrometry and Composition Measurements. *Atom Probe Tomography*. W. Lefebvre-Ulrikson, F. Vurpillot and X. Sauvage. Oxford, Academic Press: S. 123-154
- Parthasarathy, V. A., Chempakam, B. and Zachariah, J. (2008). Chemistry of spices. London, CABI
- Parthasarathy, V. A., Kandiannan, K. and Rethinam, P. (2008). Spices and Condiments. Calicut, Indian Institute of Spices Research
- Parvathy, V. A., Swetha, V. P., Sheeja, T. E., Leela, N., Chempakam, B. and Sasikumar, B. (2014). "DNA Barcoding to Detect Chilli Adulteration in Traded Black Pepper Powder." *Food Biotechnology* 28: 25 - 40
- Paul, S., Singh, P., Rudramurthy, S. M., Chakrabarti, A. and Ghosh, A. K. (2017). "Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: protocol standardization and database expansion for rapid identification of clinically important molds." *Future Microbiology* 12: 1457-1466

- Pavlovic, M., Konrad, R., Huber, I. and Busch, U. (2011). "Einsatz von MALDI-TOF in der Lebensmittelanalytik." *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 107: 9 - 16
- Peter, K. V. and Shylaja, M. R. (2012). Introduction to herbs and spices: definitions, trade and applications. *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)*. K. V. Peter. Cambridge, Woodhead Publishing: S. 1-24
- Petrakis, E. A., Cagliani, L. R., Polissiou, M. G. and Consonni, R. (2015). "Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting." *Food Chemistry* 173: 890-896
- Pontiggia, D., Spinelli, F., Fabbri, C., Licursi, V., Negri, R., De Lorenzo, G. and Mattei, B. (2019). "Changes in the microsomal proteome of tomato fruit during ripening." *Scientific Reports* 9: 14350
- Porta, T., Grivet, C., Kraemer, T., Varesio, E. and Hopfgartner, G. (2011). "Single hair cocaine consumption monitoring by mass spectrometric imaging." *Analytical Chemistry* 83(11): 4266-4272
- Prince, J. P., Lackney, V. K., Angeles, C., Blauth, J. R. and Kyle, M. M. (1995). "A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars." *Genome* 38(2): 224-231
- Pruthi, J. S. and B.M., K. (1969). "A simple technique for the rapid and easy detection of papaya seeds in black pepper berries." *Indian Food Packer* 23: 51-52
- Purle, T. (2020). "Oregano: *Origanum vulgare*." zuletzt aufgerufen am 22.11.2020, <https://www.kraeuter-buch.de/kraeuter/Oregano.html>
- Qu, L., Jiang, Y., Huang, X., Cui, M., Ning, F., Liu, T., Gao, Y., Wu, D., Nie, Z. and Luo, L. (2019). "High-Throughput Monitoring of Multiclass Syrup Adulterants in Honey Based on the Oligosaccharide and Polysaccharide Profiles by MALDI Mass Spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(40): 11256-11261
- Rau, J., Eisenberg, T. and Sting, R. (2021). "MALDI-TOF MS User Platform." zuletzt aufgerufen am 03.02.2020 <https://maldi-up.ua-bw.de/index.asp>
- Ravindran, P. N. (2005). *Black Pepper: Piper nigrum*. Tyler & Francis e-Library, CRC Press
- Ravindran, P. N. (2017). *The Encyclopedia of Herbs and Spices*. Boston, CABI
- Reeve, M. A., Pollard, K. M. and Kurose, D. (2018). "Differentiation between closely-related *Impatiens* spp. and regional biotypes of *Impatiens glandulifera* using a highly-simplified and inexpensive method for MALDI-TOF MS." *Plant Methods* 14(1): 1-13
- Rettinger, A. L. (2013). Anwendbarkeit der Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) für den Nachweis und die Differenzierung von *Leptospira* spp. im Vergleich zum Multilocus Sequence Typing (MLST), Ludwig-Maximilians-Universität München Tierärztliche Fakultät. München

- Reyes-Escogido, M., Gonzalez-Mondragon, E. G. and Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). "Chemical and pharmacological aspects of capsaicin." *Molecules* 16(2): 1253-1270
- Rezvanian, M., Ooi, Z. T., Jamal, J. A., Husain, K., Jalil, J., Yaacob, Z., Mohamad, H. F. and Ghani, A. A. (2016). "Pharmacognostic and Chromatographic Analysis of Malaysian Piper Nigrum Linn. Fruits." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 78(3): 334-343
- Rimbach, G., Nagursky, J. and Erbersdobler, H. F. (2015). *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg
- Saicon (2018). "Saicon Consulting: Blickpunkt[Recht] 2018 FoodFraud in IFS Food Version 6.1." zuletzt aufgerufen am 01.12.2020, <http://www.saicon-dls.com/alfresco/d/d/workspace/SpacesStore/308d07a8-f6f1-4b99842bcb8a7a185274/Blickpunkt%5bRecht%5d%202018%2010%20SA%20FoodFraud.pdf?guest=true>
- Sasikumar, B., Syamkumar, S., Remya, R. and John Zachariah, T. (2004). "PCR Based Detection of Adulteration in the Market Samples of Turmeric Powder." *Food Biotechnology* 18(3): 299-306
- Schlag, E. W. (2012). *Time-of-Flight Mass Spectrometry and its Applications*. Amsterdam, Elsevier Science
- Schormüller, J. (2013). *Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz*, Springer Berlin Heidelberg
- Schubert, S. and Wieser, A. (2011). "Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik." *Journal of Laboratory Medicine* 35(4): 195-203
- Schweiggert, U., Carle, R. and Schieber, A. (2007). "Conventional and alternative processes for spice production—a review." *Trends in Food Science & Technology* 18(5): 260-268
- Šebela, M. (2016). "Solid mixed matrices and their advantages in matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry." *Spectroscopy Europe* 28: 10-14
- Shiea, J., Cho, Y. T., Lin, Y. H., Chang, C. W., Lo, L. H., Lee, Y. C., Ke, H. L., Wu, W. J. and Wu, D. C. (2008). "Using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to rapidly screen for albuminuria." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(23): 3754-3760
- Silvis, I. C. J., van Ruth, S. M., van der Fels-Klerx, H. J. and Luning, P. A. (2017). "Assessment of food fraud vulnerability in the spices chain: An explorative study." *Food Control* 81: 80-87
- Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. and Rege, D. V. (1997). Chapter 8 - Spices, Flavourants and Condiments. *Handbook of Indices of Food Quality and Authenticity*. R. S. Singhal, P. R. Kulkarni and D. V. Rege, Woodhead Publishing: S. 386-456
- Soworby, H. (1852). *Capsicum anuum*. *The Flora Homoeopathica*. E. Hamilton. London: S.

- SpiceBoardIndia (2015). "List of Spices with botanical names." zuletzt aufgerufen am 07.10.2020 <https://www.indianspices.com/spices-development/spice-catalogue.html>
- SPICED (2013). "The Project: Legal ground, background and overall objectives." zuletzt aufgerufen am 20.11.2020, <http://spiced.linux17.webhome.at/the-project/legal-ground/>
- Spielmann, G., Huber, I., Maggipinto, M., Haszprunar, G., Busch, U. and Pavlovic, M. (2018). "Comparison of five preparatory protocols for fish species identification using MALDI-TOF MS." *European Food Research and Technology* 244(4): 685-694
- Spink, J. and Moyer, D. C. (2011). "Defining the Public Health Threat of Food Fraud." *Journal of Food Science* 76(9): R157-R163
- Statista (2020). "Global spices market size 2012-2019." zuletzt aufgerufen am 12.12.2020 <https://www.statista.com/statistics/876234/global-seasoning-and-spices-market-size/>
- Stein, A., Märtlbauer, A. L. and Hintermaier, B. (2018). *Food Fraud: Lebensmittelbetrug : Fälle - Recht - Analysen - Massnahmen*. München, meyer.science GmbH
- Steinecke, H. (2016). "Pfeffer." *Jahrb. Bochumer Bot. Ver.:* 7
- Suzuki, T. and Iwai, K. (1984). Chapter 4 Constituents of Red Pepper Species: Chemistry, Biochemistry, Pharmacology, and food Science of the Pungent Principle of Capsicum Species. *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. A. Brossi, Academic Press. 23: S. 227-299
- Taverna, D., Di Donna, L., Mazzotti, F., Policicchio, B. and Sindona, G. (2013). "High-throughput determination of Sudan Azo-dyes within powdered chili pepper by paper spray mass spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* 48(5): 544-547
- Teubner and Haumeier, M. (2008). *Das große Buch der Kräuter & Gewürze*. Leipzig, GRÄFE UND UNZER Verlag GmbH
- Thanushree, M. P., Sailendri, D., Yoha, K. S., Moses, J. A. and Anandharamakrishnan, C. (2019). "Mycotoxin contamination in food: An exposition on spices." *Trends in Food Science & Technology* 93: 69-80
- Ulrich, S., Biermaier, B., Bader, O., Wolf, G., Straubinger, R. K., Didier, A., Sperner, B., Schwaiger, K., Gareis, M. and Gottschalk, C. (2016). "Identification of *Stachybotrys* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408(27): 7565-7581
- Ulrich, S., Kühn, U., Biermaier, B., Piacenza, N., Schwaiger, K., Gottschalk, C. and Gareis, M. (2017). "Direct identification of edible insects by MALDI-TOF mass spectrometry." *Food Control* 76: 96-101
- Venkatesh, S., Durga, K. D., Padmavathi, Y., Reddy, B. M. and Mullangi, R. (2011). "Influence of piperine on ibuprofen induced antinociception and its pharmacokinetics." *Arzneimittel-Forschung* 61(9): 506-509

- Wang, J., Kliks, M. M., Qu, W., Jun, S., Shi, G. and Li, Q. X. (2009). "Rapid determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(21): 10081-10088
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M. and Cresti, M. (2006). "A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis." *Electrophoresis* 27(13): 2782-2786
- Webster, J. and Oxley, D. (2005). "Peptide mass fingerprinting: protein identification using MALDI-TOF mass spectrometry." *Methods in Molecular Biology* 310: 227-240
- Wenning, S. and Sandmann, A. (2018). *Gewürze und tropische Nutzpflanzen Heft 1: Kompetenzorientierte Lernaufgaben für die Sekundarstufe I*. Duisburg Essen, Books on Demand
- Wetzel, S. J., Guttman, C. M., Flynn, K. M. and Filliben, J. J. (2006). "Significant Parameters in the Optimization of MALDI-TOF-MS for Synthetic Polymerst." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17(2): 246-252
- Wilde, A. S., Haughey, S. A., Galvin-King, P. and Elliott, C. T. (2019). "The feasibility of applying NIR and FT-IR fingerprinting to detect adulteration in black pepper." *Food Control* 100: 1-7
- Williams, T. L., Andrzejewski, D., Lay, J. O. and Musser, S. M. (2003). "Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14(4): 342-351
- Winter, M. (2014). "Food Safety, Food Fraud, Food Defense." zuletzt aufgerufen am 20.11.2020, <https://www.bfr.bund.de/cm/343/food-safety-food-fraud-food-defense.pdf>
- Wolf, D. L. (1996). *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag
- Yang, J. (2013). *Potential und praktische Anwendung der MALDI-TOF Technologie für die Analyse von Bakteriengemeinschaften*, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina Fakultät für Lebenswissenschaften. Braunschweig
- Zachariah, T. J. and Parthasarathy, V. A. (2008). *Black Pepper. Chemistry of Spices*. V. A. Parthasarathy, B. Chempakam and T. J. Zachariah. UK, CABI: S. 21-40
- Ziegler, E. (1883). *Lehrbuch der allgemeinen und speciellen pathologischen Anatomie und Pathogenese* Jena, G. Fischer

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Importmengen und –werte einzelner Gewürze in Deutschland aus dem Jahr 2018 (Gewürzindustrie 2018, ITC 2018)	12
Abbildung 2:	Importe, Exporte und Inlandsverbrauch von unverarbeiteten Gewürzen in Deutschland von 2008 bis 2018 (Gewürzindustrie 2018)	13
Abbildung 3:	<i>Capsicum annuum</i> L. Illustration (Soworby 1852)	15
Abbildung 4:	<i>Origanum vulgare</i> L. Illustration (Lindman 1922)	19
Abbildung 5:	<i>Piper nigrum</i> L. Illustration (Pabst 1887)	21
Abbildung 6:	Die vier Komponenten der Lebensmittelintegrität nach Müller (2018)	23
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Ionisationsvorgangs nach Šebela (2016)	29
Abbildung 8:	MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) des Bacterial Test Standards der Firma Bruker	31
Abbildung 9:	Spitzpaprika zu Beginn des Trocknungsversuches im Trockenschrank	54
Abbildung 10:	Auftrennung von Spitzpaprika in ihre Bestandteile: Samen (A), Scheidewände (B), Fruchtfleisch ohne Exokarp (C) und Fruchtfleisch mit Exokarp (D)	55
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung eines mikrobiellen Einflusses auf die Massenspektren von Paprika	57
Abbildung 12:	Verschiedene <i>Capsicum</i> -Früchte: Peperoni (A), Habanero (B), Jalapeño (C) und zwei Chilisorten (D)	59
Abbildung 13:	Trocknung verschiedener Oregano-Pflanzen im Trockenschrank	60
Abbildung 14:	MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Spitzpaprika nach Extraktion mit der Methode A (vgl. 3.2.1)	63
Abbildung 15:	Optimiertes Extraktionsschema zur MALDI-TOF-MS Messung von Paprika	67
Abbildung 16:	MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von Spitzpaprika (inkl. Samen) extrahiert mittels optimierter Methode (A–C biologische Replikate von drei unterschiedlichen Tagen)	68
Abbildung 17:	MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von unterschiedlich getrockneter Spitzpaprika (excl. Samen)	69
Abbildung 18:	MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von getrockneter Gewürzpaprika excl. Samen (A-C biologische Replikate)	70

- Abbildung 19:** Mittlere Score Values (inkl. relativer Standardabweichung) der Massenspektren von unterschiedlich lang getrockneten Spitzpaprika (je 3 biologische und 3 technische Replikate) nach Abgleich mit einem Referenzspektrum von bereits getrockneter Gewürzpaprika 71
- Abbildung 20:** MALDI-TOF MS Spektren (2 - 16 kDa) der einzelnen Paprikabestandteile (A: Samen, B: Fruchtfleische ohne Exokarp, C: Fruchtfleisch mit Exokarp, D: Scheidewände) 72
- Abbildung 21:** 10 g Spitzpaprika (Negativ-Kontrolle mit NaCl (0,9 %)) nach 0 (A), 1 (B) und 2 (C) Wochen im Brutschrank bei 25 °C..... 74
- Abbildung 22:** 10 g Spitzpaprika (Versuchsprobe mit *Pectobacterium carotovorum*) nach 0 (A), 1 (B) und 2 (C) Wochen im Brutschrank bei 25 °C 74
- Abbildung 23:** 10 g Spitzpaprika (Versuchsprobe mit *Aspergillus niger*) nach 0 (A), 1 (B) und 2 (C) Wochen im Brutschrank bei 25 °C..... 74
- Abbildung 24:** MALDI-TOF MS Spektren von mikrobiell kontaminierter Paprika 30 min. nach Inokulierung (Zeitpunkt 0) 75
- Abbildung 25:** MALDI-TOF MS Spektren von mikrobiell kontaminierter Paprika nach einer Woche Inkubation 76
- Abbildung 26:** MALDI-TOF MS Spektren von mikrobiell kontaminierter Paprika nach zwei Wochen Inkubation 76
- Abbildung 27:** Mittlere Score Values der Massenspektren von kontaminierter Spitzpaprika (inkl. Negativ-Kontrolle) nach Abgleich mit einem Referenzspektrum von frischer gefriergetrockneter Spitzpaprika, jeweils Mittelwert aus 9 Werten inkl. Standardabweichung 77
- Abbildung 28:** Gel-Ansicht der MALDI-TOF MS Spektren (2 - 16 kDa) sechs verschiedener Paprikasorten, pro Sorte 9 Massenspektren (3 biologische und je drei technische Replikate), erstellt mittels der Software Clinpro Tools (Bruker Daltonik) 78
- Abbildung 29:** Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von verschiedenen Paprikasorten und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte..... 79
- Abbildung 30:** Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von fünf verschiedenen Gewürzpaprika (excl. Samen) und Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte..... 80
- Abbildung 31:** MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Gewürzpaprika artifiziell verfälscht mit Tomatenschalen (Verhältnisse in weight per weight (w/w)) 81

- Abbildung 32:** Mittlere Score Values von artifiziell verfälschter Paprika nach Abgleich mit dem MSP von authentischer Paprika (rot) und dem MSP des jeweiligen Verfälschungsgrades (grün); jeweils Mittelwert aus 20 Werten inkl. Standardabweichung; Unterschiede in der Zuordnung zu den MSPs waren für alle Verfälschungen hoch signifikant ($P < 0,01$; Mann-Whitney Rangsummentest)..... 82
- Abbildung 33:** Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von Gewürzpaprika (excl. Samen), Tomatenschalen und deren Mischungen und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren ($n=20$) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte 83
- Abbildung 34:** MALDI-TOF MS Spektren der Paprikaproben Nr. 1-5, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 84
- Abbildung 35:** MALDI-TOF MS Spektren der Paprikaproben Nr. 5-10, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 85
- Abbildung 36:** MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Oregano, extrahiert nach der Methode A (vgl. 3.2.1) 86
- Abbildung 37:** MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Oregano nach dreimaligem Waschen mit TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton..... 87
- Abbildung 38:** MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Oregano nach dreimaligem Waschen mit TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol (80 %) und Aceton (80 %).. 88
- Abbildung 39:** Optimiertes Extraktionsschema zur MALDI-TOF-MS Messung von Oregano 91
- Abbildung 40:** MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von Oregano nach Aufarbeitung mittels optimierter Extraktionsmethode (A-C biologische Replikate von drei unterschiedlichen Tagen) 92
- Abbildung 41:** Gel-Ansicht der MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) vier verschiedener Oreganopflanzen, je 9 Massenspektren (3 biologische und drei technische Replikate), erstellt mittels der Software Clinpro Tools (Bruker Daltonik) 93
- Abbildung 42:** Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von verschiedenen Oreganosorten und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren ($n=20$) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte..... 94
- Abbildung 43:** Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von fünf Proben *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren ($n=20$) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte..... 95
- Abbildung 44:** MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Oregano, artifiziell verfälscht mit Olivenblättern (Verhältnisse in weight per weight (w/w)) 96

- Abbildung 45:** Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von Oregano, Olivenblättern und deren Mischungen und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte..... 97
- Abbildung 46:** MALDI-TOF MS Spektren der Oreganoproben Nr. 1-3, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$) 98
- Abbildung 47:** MALDI-TOF MS Spektren der Oreganoproben Nr. 4-6, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$) 99
- Abbildung 48:** MALDI-TOF MS Spektren der Oreganoproben Nr. 7-9, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$) 99
- Abbildung 49:** MALDI TOF MS Spektrum von schwarzem Pfeffer, aufgearbeitet nach der Methode A (vgl. 3.2.1) 100
- Abbildung 50:** Optimiertes Extraktionsschema zur MALDI-TOF-Messung von Pfeffer 105
- Abbildung 51:** MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von schwarzem Pfeffer nach Aufarbeitung mittels optimierter Extraktionsmethode (A-C biologische Replikate von drei unterschiedlichen Tagen) 106
- Abbildung 52:** MALDI-TOF-MS Spektren (2-16 kDa) von weißem Pfeffer nach Aufarbeitung mittels optimierter Extraktionsmethode (A-C biologische Replikate von drei unterschiedlichen Tagen) 106
- Abbildung 53:** Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von fünf verschiedenen schwarzen Pfefferproben, einer weißen Pfefferprobe und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte..... 107
- Abbildung 54:** MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von schwarzem Pfeffer artifiziell verfälscht mit Papayasamen (Verhältnisse in weight per weight (w/w)) ... 108
- Abbildung 55:** Mittlere Score Values von artifiziell verfälschtem schwarzem Pfeffer nach Abgleich mit dem MSP von authentischem schwarzem Pfeffer (schwarz) und mit dem MSP des jeweiligen Verfälschungsgrades (grün); jeweils Mittelwert aus 20 Werten inkl. Standardabweichung; Unterschiede in der Zuordnung zu den MSPs waren für alle Verfälschungen hoch signifikant ($P < 0,01$; Mann-Whitney Rangsummentest) 109

- Abbildung 56:** Dendrogramm aus Referenzspektren (MSPs) von schwarzem Pfeffer, Papayasamen und deren Mischungen und einem Spektrum zur Abgrenzung, Prozessierung der Einzelspektren (n=20) mittels Biotyper Compass Explorer 4.1; x-Achse: Distanzlevel, y-Achse: Objekte 110
- Abbildung 57:** MALDI-TOF MS Spektren der weißen Pfefferproben Nr. 1-4, rechts: jeweils das Referenzspektrum mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$) 111
- Abbildung 58:** MALDI-TOF MS Spektren der schwarzen Pfefferproben Nr. 5-10, rechts: jeweils das MSP mit dem höchsten Score Value (\emptyset aus 9 Werten), generiert mittels Biotyper Compass Explorer 4.1 (nur wenn Score Value $\geq 1,7$) 112
- Abbildung 59:** MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Paprika nach einmaligem Waschen mit verschiedenen Waschlösungen: Ethanol (A), Aceton (B), TCA/Aceton (1/9, v/v) (C) und Methanol (D) 149
- Abbildung 60:** MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Paprika nach zweimaligem Waschen mit verschiedenen Waschlösungen: TCA/Aceton (1/9, v/v) und Aceton (A), TCA/Aceton (1/9, v/v) und Methanol (B), TCA/Aceton (1/9, v/v) und Ethanol (C) 149
- Abbildung 61:** MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Paprika nach dreimaligem Waschen mit verschiedenen Waschlösungen: TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton (A) bzw. Ethanol (B) 150
- Abbildung 62:** MALD-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von verschiedenen Paprikasorten 150
- Abbildung 63:** MALD-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Oregano nach einmaligem Waschen mit TCA/Aceton (1/9, v/v) 151
- Abbildung 64:** MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von vier verschiedenen Oreganopflanzen 151

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Organspezifische Einteilung v. Gewürzen (Parthasarathy et al. 2008).....	11
Tabelle 2:	Die domestizierten <i>Capsicum</i> -Arten, ihre Herkunft und Sortenbeispiele (McLeod et al. 1982, Breitner 2020).....	14
Tabelle 3:	Einteilung und vermutliche Herkunft von <i>Origanum vulgare</i> nach Ietswaart (1980)	18
Tabelle 4:	Spezifische Produktionsschritte der unterschiedlicher Pfeffersorten (Wenning et al. 2018)	20
Tabelle 5:	Bekannte Verfälschungen von Kräutern und Gewürzen	26
Tabelle 6:	Beispiele für Analyseverfahren zum Nachweis von Verfälschungen bei Kräutern und Gewürzen	27
Tabelle 7:	Einsatzbereiche und Anwendungsbeispiele der MALDI-TOF MS	32
Tabelle 8:	Für die Untersuchungen verwendete Paprikaprobe(n) (<i>Capsicum</i> sp. L.)	34
Tabelle 9:	Für die Untersuchungen verwendete Oreganoproben	35
Tabelle 10:	Für die Untersuchungen verwendete Pfefferproben (<i>Piper nigrum</i> L.).....	35
Tabelle 11:	Für die Untersuchungen verwendete Verfälschungsmittelproben.....	36
Tabelle 12:	Untersuchte Gewürz-Handelsproben von Paprika, Oregano und Pfeffer mit Angabe der Herkunft (falls bekannt).....	36
Tabelle 13:	Verwendete Geräte für die Probenvorbereitung, Extraktion und Bestimmung von Einflussfaktoren.....	37
Tabelle 14:	Verbrauchsmaterialien für die Probenvorbereitung, Extraktion und Bestimmung von Einflussfaktoren.....	38
Tabelle 15:	Verwendete Software zur MALDI-TOF MS Messung und Bearbeitung der Spektren	39
Tabelle 16:	Geräte und Verbrauchsmaterialien für die MALDI-TOF MS Messung.....	39
Tabelle 17:	Verwendete Isolate mit Angaben der Herkunft und Bestätigungsmethode	40
Tabelle 18:	Verwendete Nährmedien und Verdünnungsflüssigkeit mit Angaben zur Herstellung	40
Tabelle 19:	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien zur mikrobiellen Untersuchung.....	41
Tabelle 20:	Verwendete Waschlöskombinationen zur Abtrennung von Störsubstanzen von Paprika	43
Tabelle 21:	Variation der Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel	44

Tabelle 22:	Verwendete Waschlösungskombinationen zur Abtrennung von Störsubstanzen von Oregano	45
Tabelle 23:	Verwendete Waschlösungskombinationen zur Abtrennung von Störsubstanzen von Pfeffer	47
Tabelle 24:	Verschiedenen Kombinationen von Glasbeads und Probenvolumina	48
Tabelle 25:	Zeitpunkte der Ultraschallbehandlung	49
Tabelle 26:	Ausgewählte Verfälschungen für Paprika, Oregano und Pfeffer.....	61
Tabelle 27:	Auswertung der Massenspektren von Paprika nach ein- bis dreimaligem Waschen mit verschiedenen Waschlösungen (grün hinterlegt: bestes Ergebnis).....	64
Tabelle 28:	Auswertung der Massenspektren von Paprika nach Variation der Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel (grün hinterlegt: bestes Ergebnis).....	65
Tabelle 29:	Auswertung der Massenspektren von Paprika nach Variation der Probenmenge (grün hinterlegt: bestes Ergebnis)	66
Tabelle 30:	Mikrobiologischer Status der Paprika zum Zeitpunkt 0 (30 Minuten nach Inokulierung), nach einer Woche und zwei Wochen Inkubation bei 25 °C	73
Tabelle 31:	Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Oregano nach Waschen mit verschiedenen Lösungsmittelkombinationen	87
Tabelle 32:	Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Oregano nach Abwandlung der Extraktionsmethode von Wang et al. (2006).....	88
Tabelle 33:	Ergebnisse nach Änderung der Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel	89
Tabelle 34:	Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Oregano.....	90
Tabelle 35:	Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Pfeffer nach ein- bis dreimaligem Waschen mit verschiedenen Lösungsmittelkombinationen	101
Tabelle 36:	Auswertung der MALDI-TOF MS Spektren von Pfeffer nach Behandlung mittels Ultra Turrax	102
Tabelle 37:	Auswertung der Massenspektren von Pfeffer nach Behandlung mittels Tissue Lyser	102
Tabelle 38:	Auswertung der Massenspektren von Pfeffer nach Behandlung mittels Ultraschallbad.....	102
Tabelle 39:	Auswertung der Massenspektren von Pfeffer nach Änderung der Volumenverhältnisse der Extraktionsmittel	103
Tabelle 40:	Auswertung der Massenspektren von Pfeffer nach Variation der Probeneinwaage.....	104

11 Anhang

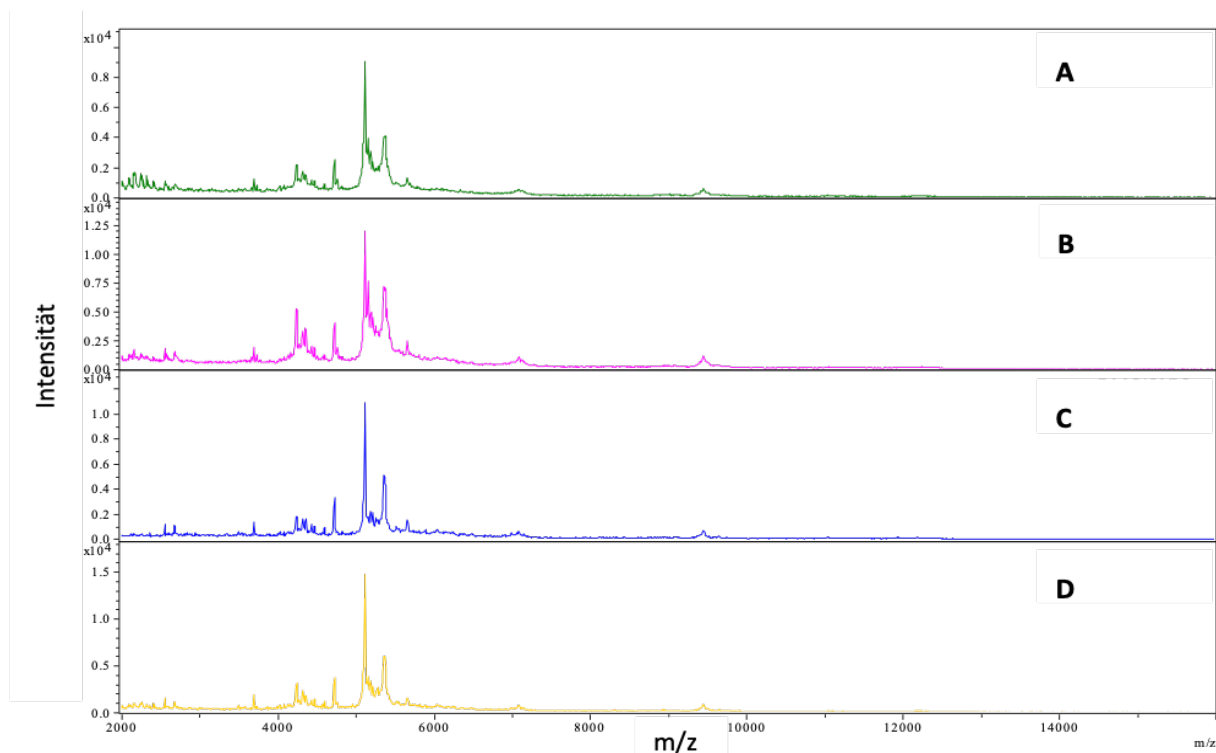


Abbildung 59: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Paprika nach einmaligem Waschen mit verschiedenen Waschlösungen: Ethanol (A), Aceton (B), TCA/Aceton (1/9, v/v) (C) und Methanol (D)

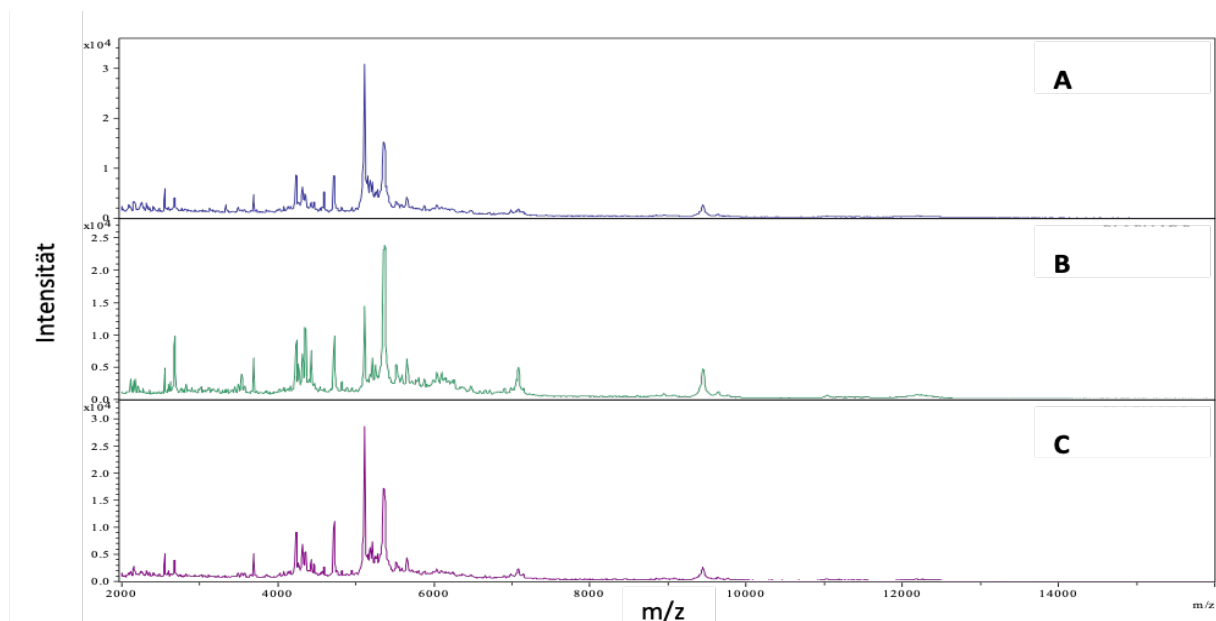


Abbildung 60: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Paprika nach zweimaligem Waschen mit verschiedenen Waschlösungen: TCA/Aceton (1/9, v/v) und Aceton (A), TCA/Aceton (1/9, v/v) und Methanol (B), TCA/Aceton (1/9, v/v) und Ethanol (C)

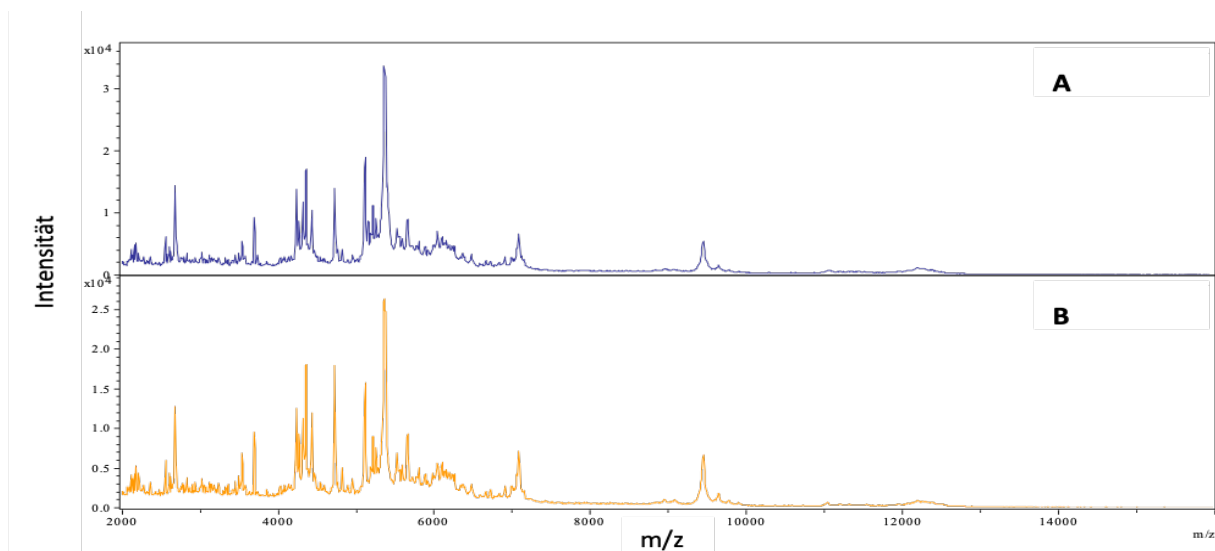


Abbildung 61: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von Paprika nach dreimaligem Waschen mit verschiedenen Waschlösungen: TCA/Aceton (1/9, v/v), Methanol und Aceton (A) bzw. Ethanol (B)

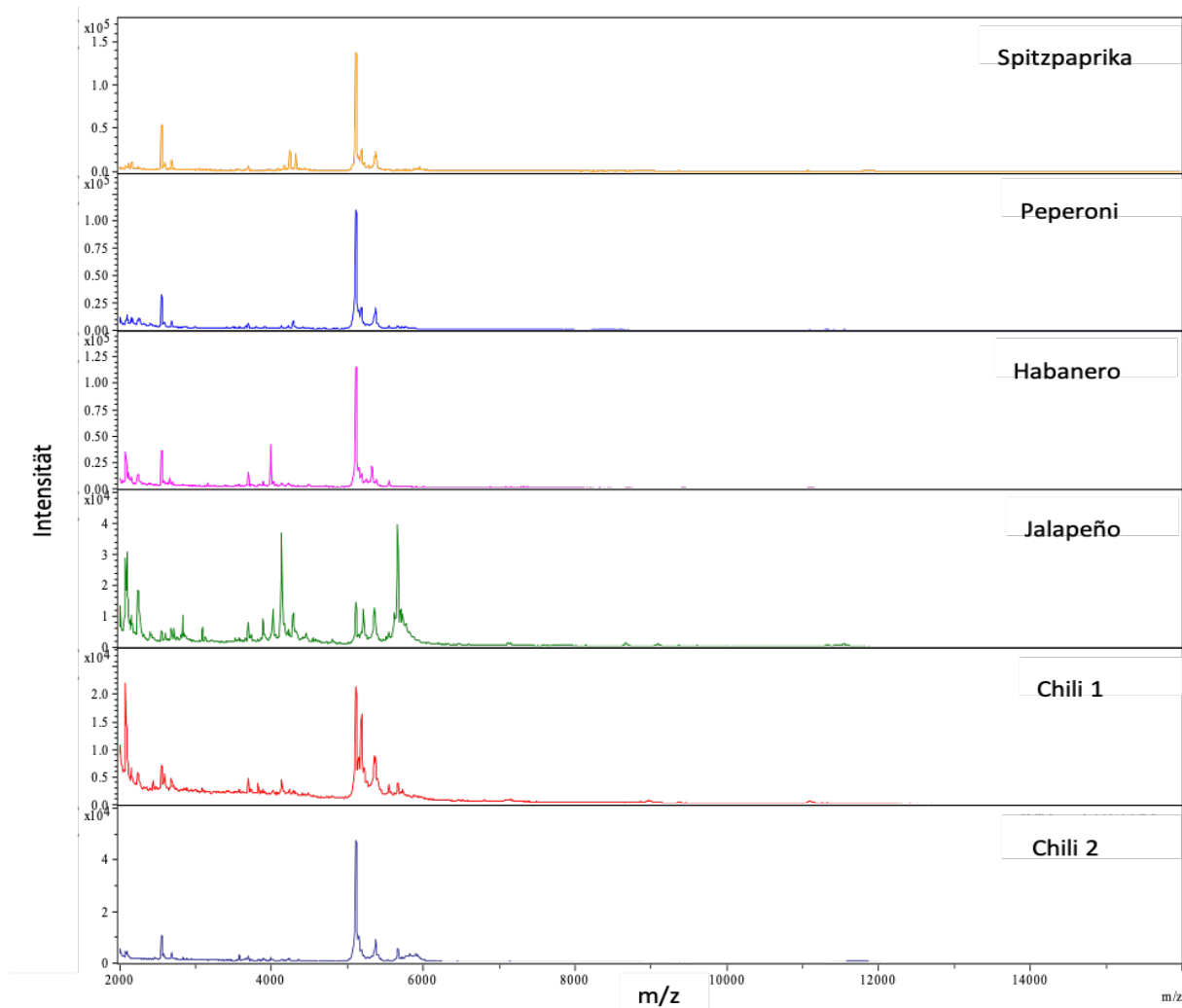


Abbildung 62: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von verschiedenen Paprikasorten

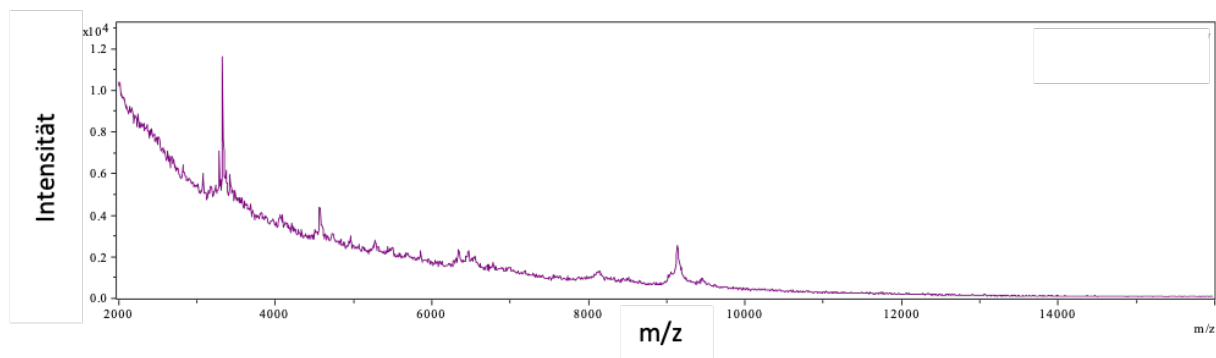


Abbildung 63: MALDI-TOF MS Spektrum (2-16 kDa) von Oregano nach einmaligem Waschen mit TCA/Aceton (1/9, v/v)

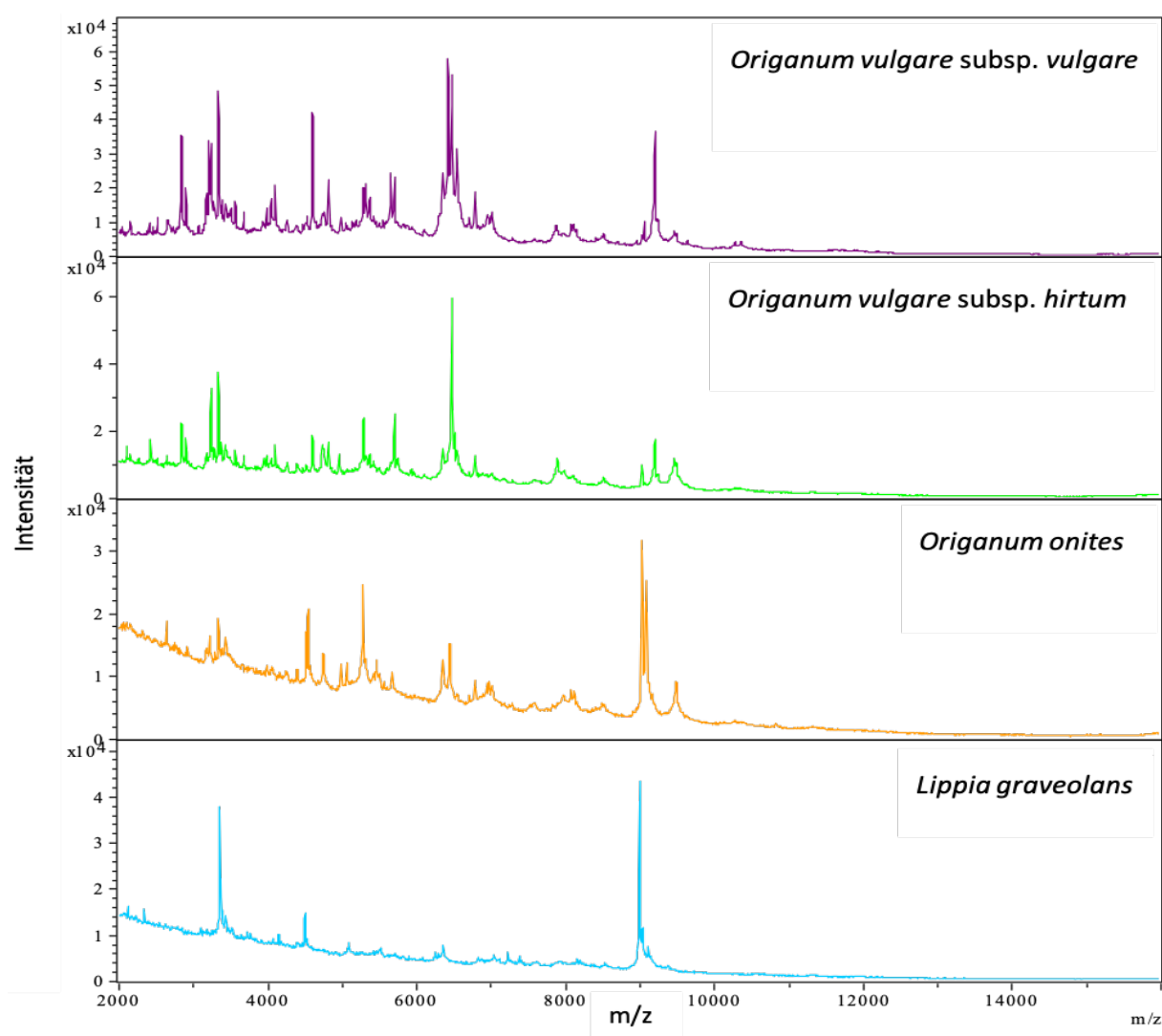


Abbildung 64: MALDI-TOF MS Spektren (2-16 kDa) von vier verschiedenen Oreganopflanzen

12 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projektes „Qualitätsbestimmung pflanzlicher Lebensmittel mittels MALDI-TOF-MS“ durch die Adalbert-Raps-Stiftung gefördert. Für die finanzielle Unterstützung und das Bereitstellen der vielen Proben möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Univ.-Professor Dr. Dr. habil. Manfred Gareis, der mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat und mich zu jeder Zeit mit Hilfe und guten Ratschlägen unterstützt hat.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Christoph Gottschalk und Dr. Florian Kaltner für die gute Betreuung, die fachliche Unterstützung und die konstruktiven Gespräche bedanken. Vielen Dank an Professorin Dr. Karin Schwaiger, die mich bei dem mikrobiologischen Teil dieser Arbeit sehr unterstützt hat.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank allen technischen Assistenten des Lehrstuhls, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders möchte ich mich bei Barbara Fritz, Sebastian Schlef, Julia Mühmel und Meike Schumann für die Hilfe bedanken. Vielen Dank auch an Sarah Eichhorn für dein immer offenes Ohr und die schnelle Hilfe bei allen organisatorischen Sachen. Bei Dr. Sebastian Ulrich bedanke ich mich für die Einarbeitung in die MALDI-TOF Technologie.

Bei allen meinen Kollegen vom Lehrstuhl möchte ich mich für die nette Aufnahme, die schöne und immer lustige Zeit am Lehrstuhl, die tollen Feiern und Grillnachmittage und den guten Zusammenhalt bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Robert und Christine, meiner Schwester Anki, meinem Freund Deniz und allen meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren immer unterstützt, motiviert und an mich geglaubt haben.